STUDIEN ZU GEHALT UND REGULATION VON OPIOIDEN AN PERMANENTEN ZELLKULTUREN DES NERVENSYSTEMS

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
THOMAS GLASER
München, 10. Juni 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0019

STUDIEN ZU GEHALT UND REGULATION VON OPIOIDEN AN PERMANENTEN ZELLKULTUREN DES NERVENSYSTEMS

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
THOMAS GLASER
München, 10. Juni 1981

STUDIEN ZU GEHALT UND REGULATION VON OPIOIDEN AN PERMANENTEN ZELLKULTUREN DES NERVENSYSTEMS.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER

FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE

DER

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT

MÜNCHEN

VORGELEGT

VON

THOMAS GLASER

MÜNCHEN 1981

1. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. G. HARTMANN

2. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. H. HÖRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1977 bis März 1981 auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. B. Hamprecht zuerst am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (bis August 1979), später am Institut für Physiologische Chemie der Universität Würzburg ausgeführt.

Herrn Dr. Hamprecht danke ich herzlich für die Anregung und die hervorragende Anleitung zu dieser Arbeit, für viele Diskussionen und die Unterstützung, die er mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Fräulein W. Klebensberger (Juni 1977 - Sept. 1978), Fräulein Ch. Stadtkus (Juni 1978 - August 1979) und Fräulein K. Hübner (Nov. 1979 - März 1981) danke ich besonders für ihre ausgezeichnete, ausdauernde, zuverlässige und geschickte Mitarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden bedanken, die durch große Hilfsbereitschaft, Diskussionen und kritische Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Dr. Gossrau und Herrn Dr. Kugler, Anatomisches Institut der Universität Würzburg, danke ich für die Anfertigung von Gefrierschnitten. Ferner gilt mein Dank Herrn K. Wagner für die Erstellung von Rechenprogrammen. Meiner Frau danke ich besonders für ihre Geduld und ihr Verständnis, wodurch sie viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ferner gilt mein Dank der Max-Planck-Gesellschaft und den Sonderforschungsbereichen 51 und 105, die die Durchführung dieser Arbeit materiell und finanziell unterstützten.

MEINEN LIEBEN ELTERN

MEINER LIEBEN GABI

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. ERGEBNISSE	14
I. Entwicklung und Beschreibung von Test-systemen zur Bestimmung von Opioidaktivität	14
I. 1. Entwicklung eines Meß-Systems für cyclo AMP mit erhöhter Sensitivität	15
1.1. Vorbemerkung und Vorversuche	15
1.2. Temperaturmessungen in 24-Behälter-Gewebekulturplatten	26
1.3. Einfluß der Erwärmung bei verschiedenen Temperaturen auf den cyclo AMP-Gehalt	28
1.4. Einfluß der Kultivationsdauer auf die Stimulierbarkeit durch Prostaglandin E_1	30
1.5. Vergleich von cyclo AMP-Messungen an Hybridzellen in Petrischalen und 24-Behälter-Gewebekulturplatten	32
1.6. Opioide hemmen die Bildung von cyclo AMP in Hybridzellen in 24-Behälter-Gewebekulturplatten	35
I. 2. Beschreibung eines Meß-Systems für die Bindung von Opioiden an Hybridzell-rezeptoren	41

Seite

2.1. Vorbemerkung 41

2.2. Bindung von ^{3}H-Naloxon an Zellen in Suspension 44

2.3. Kompetition von Opioiden und anderen Neurohormonen mit ^{3}H-Naloxon um die Bindungsstellen 49

2.4. Bindung von ^{3}H-Naloxon und ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen 51

2.5. Kompetition von Opioiden mit ^{3}H-Naloxon und ^{3}H-Leu-Enkephalin um die Bindungsstellen 54

2.6. Somatostatin bindet nicht an Opioidrezeptoren von Hybridzellen 60

I. 3. Beschreibung eines Radioimmunotests zur quantitativen Bestimmung von Enkephalinen 63

I. 4. Zusammenfassung 66

II. Reinigung und Charakterisierung von Opioidpeptiden aus Hybridzellen 69

II. 1. Untersuchungen an Rohextrakten 70

1.1. Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen hemmen die Bildung von cyclo AMP 70

1.2. Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen hemmen die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Opioidrezeptoren und an spezifische Antikörper 73

Seite

1.3. Reinigung von Hybridzellextrakten mittels Gelchromatographie und Vorversuche zur Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen 75

1.4. Vergleich von Biogel P4-gereinigten Extrakten verschiedener Herkunft mit Hybridzellextrakten im cyclo AMP-Test 85

II. 2. Studien zur Reinigung von Opioidpeptiden aus Hybridzellextrakten 90

2.1. Reinigung mittels Gelchromatographie 91

2.2. Reinigung mittels Adsorptionschromatographie 95

2.3. Kombination zweier Reinigungsschritte zur Abtrennung von Opioiden aus Zellextrakten 98

2.4. Vergleich verschiedener Methoden der Extraktion von Opioiden aus Hybridzellen 105

2.5. Zusammenfassung 107

II. 3. Studien zur Charakterisierung von Opioidpeptiden aus Hybridzellextrakten 109

3.1. Behandlung von partiell gereinigten Extrakten mit Proteasen 109

3.2. Reinigung der Extrakte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 111

3.3. Bestimmung der Opioidaktivität in Extrakten nach Dünnschichtchromatographie 116

3.4. Bestimmung der Opioidaktivität nach Hochspannungspapierelektrophorese 118

Seite

3.5. Behandlung des Met- und Leu-Enkephalin-ähnlichen Materials aus Hybridzellen mit Bromcyan 121

3.6. Dansylierung von synthetischen Enkephalinen und Hybridzellopioiden vor und nach Hydrolyse 122

3.7. Versuche zur Lokalisation von Enkephalinen in Hybridzellen mittels indirekter Immunfluoreszenz 131

3.8. Einbau von radioaktivem Methionin und Leucin in Hybridzellen 133

II. 4. Studien zum Opioidgehalt in verschiedenen Zell-Linien sowie fötalem Kälberserum 135

II. 5. Zusammenfassung 143

III. Untersuchungen zur Regulation des Opioidpeptidgehalts in Hybridzellen 146

III. 1. Einfluß der Kulturbedingungen auf den Opioidgehalt 147

1.1. Vorbemerkung 147

1.2. Einfluß der Temperatur im Brutschrank 150

1.3. Einfluß der Zelldichte und Wachstumsdauer 151

1.4. Einfluß verschiedener fötaler Kälberseren im Wachstumsmedium auf den Opioidgehalt der Hybride 153

III. 2. Einfluß von Hormonen und Drogen auf den Opioidgehalt in Hybridzellen 155

Seite

2.1. Einfluß verschiedener Hormone und Drogen 156

2.2. Einfluß von Steroidhormonen 159

2.3. Charakterisierung des stimulatorischen Effekts von Dexamethason auf den Opioidgehalt in Hybridzellen 163

III. 3. Versuche zur Freisetzung von Opioiden aus Hybridzellen 168

III. 4. Versuche zur Freisetzung von Enkephalinen aus einem hypothetischen Vorläufermolekül im Homogenat 172

III. 5. Zusammenfassung 173

IV. Vorläufige Untersuchungen über Nicht-Opioidfaktoren aus Hybridzellen 176

IV. 1. Versuche zur Charakterisierung der höhermolekularen Faktoren aus Hybridzellen 177

1.1. Isolierung und Bestimmung der Aktivität 177

1.2. Verschiedene Antagonisten beeinflussen die Wirkung der höhermolekularen Faktoren nicht 183

1.3. Chemische Natur und Stabilität der höhermolekularen Faktoren 185

1.4. Weitere Reinigung der höhermolekularen Faktoren durch Gel- und Ionenaustausch-Chromatographie 191

IV. 2. Zusammenfassung 197

Seite

C. EXPERIMENTELLER TEIL 200

I. Verwendete Geräte, Materialien und Reagentien 200

I.1. Geräte 200

1.2. Materialien 203

1.3. Reagentien 204

II. Zellkultur 207

II.1. Verwendete Zell-Linien 207

II.2. Primärkulturen 209

II.3. Methoden 210

III. Cyclo AMP-Bestimmung 211

III.1. Isolierung von cyclo AMP-Bindungsprotein 211

III.2. Inkubation von Zellen mit Hormonen, Drogen und Extrakten 212

III.3. Reinigung und Bestimmung des intrazellulären cyclo AMP 213

IV. Durchführung der Bindungsexperimente 216

IV.1. Bindung von radioaktivem Naloxon an Hybridzellen in Suspension 216

IV.1.1. Zellernte 216

1.2. Inkubation der Zellen mit Zusätzen und radioaktivem Naloxon 217

IV.2. Bindung von Opioiden an Hybridzellmembranen 218

IV.2.1. Herstellung von Membranen 218

IV.2.2. Inkubation der Membranen mit radioaktiven Opioiden und Zusätzen 219

Seite

V. Bestimmung von Opioidaktivität mittels eines radioimmunologischen Tests 222

VI. Herstellung und Reinigung von Zellextrakten 224

VI. 1. Partiell gereinigte Extrakte 224

VI. 2. Weitere chromatographische und analytische Verfahren 227

VI. 2.1. Gelchromatographie 227

VI. 2.2. Ionenaustauschchromatographie 228

VI. 2.2.1. mit Whatman DE 52 228

VI. 2.2.2. mit AG 1-X 8 229

VI. 2.2.3. mit Sephadex CM-50 229

VI. 2.3. Dünnschichtchromatographie 230

VI. 2.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 231

VI. 2.5. Hochspannungspapierelektrophorese 233

VI. 3. Reinigung und Silanierung von Glasgefäßen 234

VII. Behandlung von Extrakten mit verschiedenen Reagentien 236

VII. 1. Behandlung mit Proteasen 236

VII. 1.1. Allgemeine Vorschrift 236

VII. 1.2. Behandlung mit Pepsin 237

VII. 1.3. Behandlung mit einer Enzymmischung 237

VII. 2. Behandlung mit Bromcyan 238

VII. 3. Behandlung mit Perameisensäure 238

VII. 4. Behandlung mit Wasserstoffperoxid 239

Seite

VII. 5. Behandlung mit Jodchlorid 240

VII. 6. Behandlung mit Ninhydrin 241

VII. 7. Behandlung mit Fluram 241

VII. 8. Behandlung mit Diazomethan 242

VII. 9. Behandlung mit Jodessigsäure 242

VII. 10. Behandlung mit Dithiothreitol 243

VII. 11. Behandlung mit Säure und Lauge 243

VII. 12. Durchführung einer Dialyse kleiner Volumina 243

VIII. Reaktionen zur Strukturaufklärung des enkephalin-ähnlichen Materials aus Hybridzellen 244

VIII. 1. Dansylierung von Peptiden 244

VIII. 2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure 247

VIII. 3. Totalhydrolyse und Dansylierung der Aminosäuren 248

VIII. 4. Durchführung der Autoradiographie 248

IX. Indirekte Immunfluoreszenz 249

IX. 1. Indirekte Immunfluoreszenz an fixierten Zellen 249

IX. 2. Indirekte Immunfluoreszenz an Zellschnitten 250

IX. 3. Präadsorption der Seren an Hybridzellen 251

Seite

X. Sonstige Methoden 252

X. 1. Extraktion von Serum 252

X. 2. Extraktion von serumfreiem Wachstumsmedium 253

X. 3. Spezielle Inkubations- und Wachstumsmedien 253

X. 4. Präparation und Extraktion von Tumoren 254

X. 5. Extraktion von Rattengehirnen 255

X. 6. Präparation von Rattengehirnmembranen 255

X. 7. Inkubation von Hybridzellen mit radioaktiven Aminosäuren 257

X. 8. Proteinbestimmung 257

X. 9. Dialyse von FCS 257

X. 10. Adenylatcyclasetest 257

D. ZUSAMMENFASSUNG 258

E. LITERATURVERZEICHNIS 264

LEBENSLAUF

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AcO	Acetat
AcOH	Essigsäure
AcCH	Acetylcholin
AcChE	Acetylcholinesterase
BB	Bio-beads
BUDR	5-Bromodesoxyuridin
1-BuOH	Butanol-1
Ci	Curie
CPA	Carboxypeptidase A
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (counts per minute)
cyclo AMP	Adenosin-3', 5'-cyclisches Monophosphat
Dansylchlorid	Dimethylnaphtalinsulfonylchlorid
DBCA	N^6, $O^{2'}$-Dibutyryl-cyclo AMP
DC	Dünnschichtchromatographie
Dl/Glu/Suc	Puck's Medium Dl mit Glucose und Saccharose
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DnsCl	Dansylchlorid
DnsOH	Dansylhydroxid
dpm	wirkliche Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)

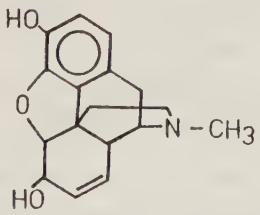
EC_{50}	Konzentration, bei der 50 % der maximalen Stimulation auftritt (excitatory concentration fifty)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (ethylamino)-tetraacetat
Enk	Enkephalin
EtOH	Ethanol
Exp	Experiment
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FiTC	Fluoresceinisothiocyanat
fmol	femtomol
GB	Gesamtbindung
h	Stunden
HAT	Hypoxanthin + Aminopterin + Thymidin
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazin-ethan-sulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HVPE	Hochspannungspapierelektrophorese (high voltage paper electrophoresis)
IBMX	1-Methyl-3-Isobutylxanthin
IC_{50}	Konzentration, bei der 50 % Hemmung auftritt (inhibitory concentration fifty)

Kap.	Kapitel
K_D	Dissoziationskonstante
l	Liter
Leu-Enk(ephalin)	Leucin-Enkephalin
LAP	Leucinaminopeptidase
M	molar
mM	millimolar
/uM	mikromolar
Met-Enk(ephalin)	Methionin-Enkephalin
Met(O)-Enk	oxidiertes Met-Enkephalin
min	Minuten
ml	Milliliter
mOsmol	Milliosmol
Multiplatten	24-Behälter-Gewebekulturplatten
NA	Noradrenalin
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
P	Passage
PAS	Perameisensäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PGE_1	Prostaglandin E_1
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Ref.	Referenz
RIA	Radioimmunoassay
RO 20-1724	4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinon
RP	Reversed-phase
SB	Spezifische Bindung
SD	Standardabweichung (standard deviation)
Sec	Sekunden
SRIF	Somatostatin (somatotropin release inhibitory factor)
TCA	Trichloressigsäure (trichloro acetic acid)
6-TG	6-Thioguanin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UB	unspezifische Bindung
UpM	Umdrehungen pro Minute
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
ZNS	Zentralnervensystem

A. EINLEITUNG

Schon im Altertum war Opium als Analgetikum und Rausch erzeugendes Mittel wohl bekannt. Der Begriff Opium stammt von dem griechischen Wort opion, was soviel bedeutet wie Saft des Mohns. Opium wird aus dem Saft des Schlafmohns Papaver Somniferum gewonnen. 1803 gelang es dem Paderborner Apotheker Friedrich Sertürner (1), aus Opium das Morphin zu isolieren. Er benannte es nach Morpheus, dem griechischen Gott der Träume. Die richtige Summenformel $C_{17}H_{19}NO_3$ wurde 1848 von Laurent (2) aufgeklärt, die endgültige Struktur aber erst 1955 (3).



Morphin

Morphin, ein Phenanthrenalkaloid, ist hauptverantwortlich für die pharmakologischen Wirkungen des Opiums. Die Effekte von Morphin auf den Organismus sind vielfältig. Es beeinflußt das Zentralnervensystem (ZNS), wirkt aber auch peripher, vor allem auf den Gastrointestinal-Trakt. Der wichtigste Effekt im ZNS, dem das Morphin auch seine bedeutende klinische Stellung verdankt, ist die Erzeugung

von Analgesie (Schmerzlinderung). Zudem wird das Gefühl von Euphorie erzeugt, werden Atmungszentrum und einige Rückenmarksreflexe gelähmt und endokrine Funktionen beeinflußt. Die Wirkungen auf den Gastrointestinal-Trakt äußern sich in einer verringerten Peristaltik und einer verringerten Sekretion von HCl in den Magen, sowie von Galle und Pankreassaft in den Darm. Der Hauptnachteil von Morphin und seinen Analoga für ihre Verwendung als Therapeutika liegt darin, daß sie Sucht und Toleranz hervorrufen, beides Phänomene, deren biochemische Ursachen bis heute noch nicht endgültig geklärt sind.

Opiate wirken im tierischen und menschlichen Organismus über spezifische Rezeptoren, die sogenannten Opiatrezeptoren. Mit der Entwicklung radioaktiver Opiate mit hoher spezifischer Radioaktivität konnten Opiatrezeptoren durch Bindungsstudien im Gehirn nachgewiesen werden (4-6). Nach Injektion radioaktiver Opiate in Versuchstiere wurden durch Autoradiographie an Gehirnschnitten ebenfalls Opiatbindungsstellen gefunden (7, 8). Weitere Studien zeigten, daß Opiatrezeptoren in verschiedenen Gehirnregionen unterschiedlich stark konzentriert sind (9-12). Die Stellen hoher Rezeptordichte gehören alle zum limbischen System bzw. sind mit diesem assoziiert. Das limbische System bildet einen Ring aus entwicklungsgeschichtlich sehr alten, verschiedenen Strukturen in der Tiefe des Gehirns (Abb. 1). Nur der ebenfalls dazugehörige Hippocampus besitzt verhältnismäßig wenige Opiatrezeptoren. Das limbische

System wird in Zusammenhang gebracht mit der Steuerung von Emotionen, sensorischen Funktionen und Verhaltensweisen. Angenehme Gefühle und Analgesie werden hier erzeugt, wie durch Experimente mit ins Gehirn eingepflanzten Elektroden gezeigt wurde (13).

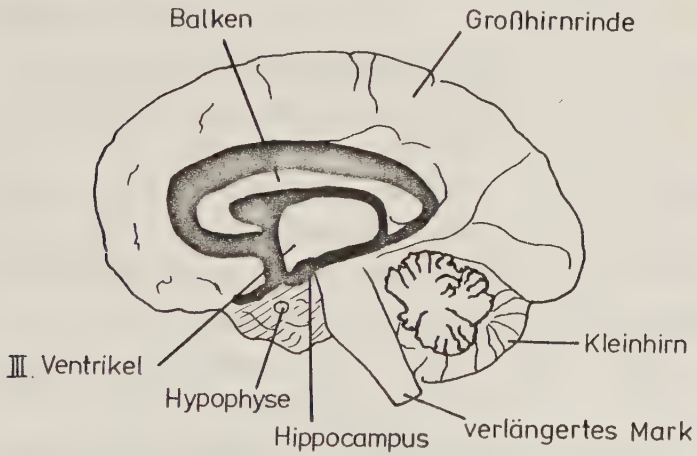


Abb. 1. Längsschnitt durch die Mitte eines Gehirns. Ausgefüllt eingezeichnet ist das limbische System.

Im Kleinhirn und der weißen Gehirnsubstanz, bestehend aus Nervenbahnen und Gliazellen, werden praktisch keine Bindungsstellen für Opiate gefunden.

Neben der direkten Untersuchung von Opiatrezeptoren mittels Bindungsstudien, kann man auch indirekt an biologischen Testsystemen arbeiten. Der Samenleiter der Maus

und das Ileum (Abschnitt des Darms) des Meerschweinchens haben sich als besonders günstig herausgestellt, da dort viele Opiatrezeptoren vorhanden sind. Gemessen werden die durch elektrische Stimulation ausgelösten, rhythmischen Kontraktionen, die durch Zugabe von Opiaten gehemmt werden (14, 15). Auf Grund von Kompetitionsstudien mit verschiedenen Opiatagonisten und -antagonisten sowohl in Bindungsexperimenten als auch in biologischen Tests wurde die Existenz verschiedener Opiatrezeptortypen postuliert (16-22). Diese Rezeptorpopulationen werden mit den griechischen Buchstaben μ (für Morphinbindung), δ (für den Enkephalinrezeptor), κ (für die Ketocyclazocin-Bindungsstellen) und σ (für die Bindung von N-allyl-norphenazocin, SKF-10,047) bezeichnet. Die derzeit am besten untersuchten Typen sind der μ und der δ -Rezeptor. Beide Arten sind im Rattengehirn unterschiedlich lokalisiert (22). μ-Rezeptoren sollen die analgetischen Wirkungen von Opiaten vermitteln (23), während die sedativen (16) und die das Verhalten betreffenden Effekte (24, 25) über δ-Rezeptoren erzeugt werden. Im Meerschweinchenileum überwiegen die μ-Rezeptoren, während im vas deferens der Maus hauptsächlich δ-Rezeptoren gefunden werden (17). Was das physiologisch zu bedeuten hat, ist noch unklar. Die Existenz verschiedener Subpopulationen von Rezeptoren für Hormone innerhalb eines Organismuses ist nichts Ungewöhnliches. Beschrieben wurden pharmakologisch unterscheidbare Rezeptoren für Acetylcholin (26), Noradrenalin (27), Histamin (28) und Adenosin (29).

Morphin ist ein pflanzliches Alkaloid und kommt im Körper von Tieren nicht vor. Deshalb müssen körpereigene Liganden der Opiatrezeptoren existieren. Hughes und Kosterlitz isolierten 1975 aus Schweinegehirn zwei opiataktive Pentapeptide, Methionin- und Leucin-Enkephalin (Met- bzw. Leu-Enkephalin) (30). Die Aminosäuresequenz der Enkephaline ist:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH Met-Enkephalin
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH Leu-Enkephalin

Eine Reihe weiterer Opiatpeptide wurde bis heute isoliert und charakterisiert, wie α-Endorphin (31, 32), ß-Endorphin (33-36), γ-Endorphin (31), α-Neo-Endorphin (37), Dynorphin (38), BAM-12P (39), Met-Enkephalin-Arg^6 (40) und Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 (41). Diese Peptide werden mit den klassischen Opiaten unter dem Begriff Opioide zusammengefaßt. Der Begriff "Opiat" wird deshalb in zunehmendem Maß durch den Begriff "Opioid" ersetzt. Im Folgenden wird dementsprechend nur noch der neue Begriff verwendet. Die Aminosäuresequenz von Met-Enkephalin entspricht den Aminosäuren 61-65 des ß-lipotropen Hormons (ß-LPH, (42)). Die Aminosäuren 61-91 von ß-LPH entsprechen dem ß-Endorphin, während 61-77 dem γ-Endorphin und 61-76 dem α-Endorphin gleichen (Abb. 2).

H-Glu-Leu-Thr-Gly-Gln-Arg-Leu-Arg-Gln-Gly-^{10}

Asp-Gly-Pro-Asn-Ala-Gly-Ala-Asn-Asp-Gly-^{20}

Glu-Gly-Pro-Asn-Ala-Leu-Glu-His-Ser-Leu-^{30}

Leu-Ala-Asp-Leu-Val-Ala-Ala-Glu-Lys-Lys-^{40}

Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-^{50}

Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-Lys-Arg-^{60}

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-^{70}

Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-^{80}

Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-^{90}

Glu-OH

---

61 - 65 Met-Enkephalin

61 - 76 α -Endorphin

61 - 77 γ -Endorphin

61 - 91 β -Endorphin

Abb. 2.Aminosäuresequenz von menschlichem ß-LPH

Entsprechend Abb. 3 dient ß-LPH dem ß-Endorphin und dem γ-LPH als Vorläufermolekül. α- und γ-Endorphin entstehen proteolytisch aus ß-Endorphin . ß-LPH seinerseits entsteht aus Proopiocortin, einem 31 K-Protein, das gleichzeitig noch als Vorläufer für Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), für die Melanocyten- stimulierenden Hormone (α,-ß,- γ-MSH) und für ein in seiner Funktion noch unbekanntes 16 K-Fragment dient (43). Diese zuerst aus Einbauexperimenten von radioaktiven Aminosäuren gewonnenen

Erkenntnisse sind inzwischen durch Sequenzierung der entsprechenden klonierten cDNA bestätigt worden (44).

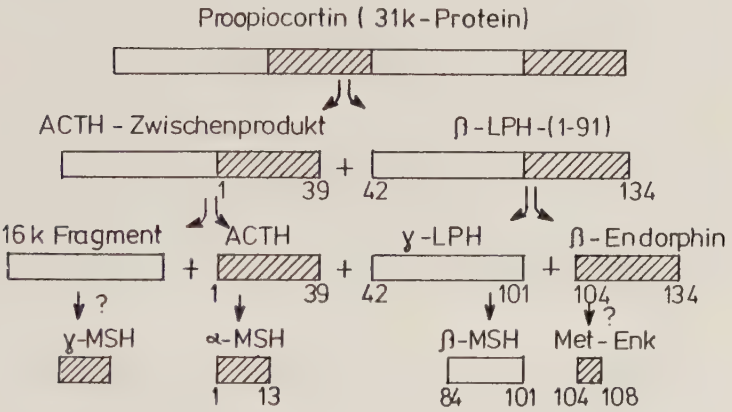


Abb. 3 Schematische Darstellung des Biosynthesewegs der Hormone, die vom Proopiocortin abgeleitet sind.

ACTH = Adrenocorticotropes Hormon

MSH = Melanocyten-stimulierendes Hormon

LPH = Lipotropes Hormon

Obwohl die Sequenz von Met-Enkephalin in der von ß-Endorphin enthalten ist, sprechen etliche Befunde dagegen, daß Met-Enkephlin aus ß-Endorphin entsteht:

a.) Enkephaline und Endorphine sind im Gehirn unterschiedlich verteilt (45, 46).

b.) Bisher konnten ß-Endorphin und Enkephaline mit immunhistochemischen Methoden nicht in einem Neuron gemeinsam nachgewiesen werden (47).

c.) Enkephalin- und ß-Endorphin-System entwickeln sich unabhängig voneinander. Untersuchungen in verschiedenen Stadien der Entwicklung sprechen dafür (48).

d.) Da hohe Konzentrationen von ß-Endorphin in der Hypophyse vorhanden sind, sollte Hypophysektomie den Enkephalingehalt im Gehirn beeinflussen. Dies ist nicht der Fall (49).

e.) Das ß-LPH -ß- Endorphin-System könnte nur die Existenz von Met-Enkephalin erklären (Methionin in der Position 65). Bisher konnten ein ß-LPH oder ß-Endorphin mit Leucin in Position 65 nicht eindeutig nachgewiesen werden.

f.) Im Nebennierenmark werden vermutliche Enkephalin-Vorläufermoleküle gefunden, die die Met- und Leu-Enkephalinsequenz in einem Molekül enthalten. Durch Trypsin und Carboxypeptidase B können beide Enkephaline freigesetzt werden (50, 51). Gegen ein gemeinsames Enkephalinvorläuferprotein spricht der Befund, daß Met- und Leu-Enkephalin in verschiedenen Neuronen gefunden werden (52). Dieser Befund könnte aber durch unterschiedliche Regulation (unterschiedliches "processing") in verschiedenen Zellen bedingt sein.

Die Opioidpeptide verhalten sich in allen Opiattestsystemen wie klassische Opiate. Sie kompetieren mit Morphin und seinen Analoga um dieselben Bindungsstellen, wobei, wie oben erwähnt, die Affinitäten zu μ- und δ-Rezeptoren unterschiedlich sind (17, 20, 53-55). Die endogenen

Opioide verhindern die Kontraktion des Meerschweinchen-Ileums und des vas deferens der Maus (30). Unter bestimmten Bedingungen können sie Analgesie (56) und Phänomene wie Opiatsucht und Opiattoleranz hervorrufen (57, 58). Sie inhibieren die elektrische Aktivität vieler Neuronen (Übersichtsartikel 59), haben manchmal aber auch excitatorische Wirkung. Sie können auch Hormone und Neurotransmitter Ca^{2+}-abhängig freisetzen oder deren Freisetzung inhibieren (Übersichtsartikel 60). Wie die verschiedenen Effekte auf molekularer Ebene erzeugt werden, ist noch nicht bekannt.

Im Gehirn entspricht die Verteilung der Opioidpeptide nahezu vollständig der der Opioidrezeptoren, mit Ausnahme des Globus pallidus, wo die höchsten Enkephalin-Konzentrationen im Gehirn gefunden werden, aber nur wenige Opioidrezeptoren (46, 61). Enkephaline sind im ZNS weit verbreitet, ß-Endorphin dagegen kommt nur im Hypothalamus in größeren Mengen vor. In der Adenohypophyse und der Pars intermedia findet man große Mengen ß-Endorphin, aber keine Enkephaline. In der weißen Gehirnsubstanz und dem Kleinhirn sind praktisch keine Opioidpeptide nachweisbar. Beide Enkephaline werden auch in Neuronen des Rückenmarks gefunden (62), sowie im Gastrointestinaltrakt verschiedener Tiere, wobei aber die absoluten Mengen von Spezies zu Spezies stark variieren (63). Met-Enkephalin soll auch im menschlichen Plasma vorhanden

sein (64), obwohl es nach einem anderen Befund im Plasma sehr rasch proteolytisch gespalten wird (65). ß-Endorphin dagegen ist in Plasma sehr stabil. Seine Konzentrationen im menschlichen Plasma schwanken um 5 fmol/ml (66-69). Peripher wurde ß-Endorphin immunhistochemisch in den D-Zellen des Pankreas und in der Nebenniere gefunden (70).

Opioidrezeptoren und Opioidpeptide sind in Neuronen vorhanden. Da in einem so komplexen Organ wie dem Gehirn es außerordentlich schwierig ist, die Biosynthese von Opioidpeptiden sowie ihre Regulation zu untersuchen, ist es wünschenswert, ein geeignetes Modellsystem zu haben. Durch die Entwicklung klonaler, permanenter Zell-Linien aus Nervengewebstumoren, erstmals durch G. Augusti-Tocco (71), sind Modellsysteme für Neuronen verfügbar geworden (z. B. 72-74). Bislang ist aber noch keine Zell-Linie beschrieben worden, die Enkephaline synthetisiert.

Ein weiteres neuronales Modellsystem stellen Hybridzellen dar, die von B. Hamprecht entwickelt wurden (Übersichtsartikel 75, 76). Hybridzellen können durch Fusion von verschiedensten Zellen miteinander erzeugt werden. Fusogene Agentien sind z. B. Polyethylenglykol, Lysolecithin oder inaktivierter Sendaivirus. Durch die Fusion entstehen zuerst Zellen mit 2 oder mehr Zellkernen, sogenannte Heterokaryonten. Wenn ein Heterokaryon sich teilt, entstehen zwei Tochterzellen mit je einem Zellkern, der

Chromosomen aus beiden Elternzellen enthält (Abb. 4). Diese Zellen sind die Hybridzellen. Da verschiedene Fusionsprodukte entstehen und auch nur ein Teil der Elternzellen an der Fusion teilnimmt, müssen reine Hybridzellpopulationen durch Klonierung und geeignete Selektion gewonnen werden.

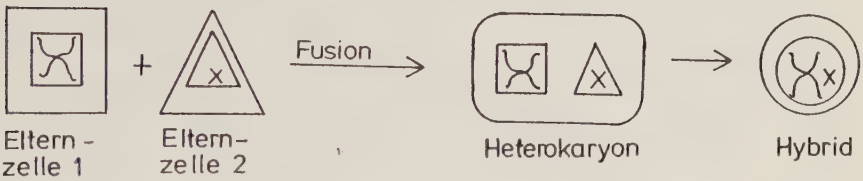


Abb. 4. Schematische Darstellung einer Zellfusion (nach 77).

Durch Fusion von Mäuse-Neuroblastomazellen N18TG2 mit Ratten-Gliomazellen C6-BU-1 und anschließende Klonierung wurden die Klone 108CC5 und 108CC15 erhalten (Übersichtsartikel 75). In den Hybridzellen sind manche Eigenschaften stark ausgeprägt, die in den Elternzellen schwach oder gar nicht vorhanden sind (75). Die Hybridzellen 108CC15 besitzen viele neuronale Eigenschaften (75, 76):

a) elektrische Erregbarkeit
b) Fähigkeit zur Bildung langer Fortsätze
c) klare und "dense core"-Vesikel von 500-700 bzw. 1000-2000 Å Durchmesser
d) Enzyme zur Synthese von Neurotransmittern (Cholinacetyltransferase, Dopamin-ß-Hydroxylase)

e) spezifische Aufnahmesysteme für Neurotransmitter

f) Fähigkeit, Synapsen zu bilden

g) Rezeptoren für einige Neurohormone.

Die Rezeptoren sind mit dem Adenylatcyclasesystem gekoppelt. Hormone wie Prostaglandin E_1 (PGE_1), Adenosin, Secretin und Glucagon erhöhen den intrazellulären Spiegel von cyclischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat (cyclo AMP). Acetylcholin (AcCh), Noradrenalin (NA), Somatostatin und die Opioide hemmen den durch PGE_1 hervorgerufenen Anstieg des cyclo AMP-Spiegels. Der Effekt von AcCh wird durch muskarinische Antagonisten wie Atropin, der von Noradrenalin durch α-adrenerge Antagonisten wie Phentolamin und der der Opioide durch Naloxon gehemmt.

Die Hybridzellen 108CC15 besitzen Acetylcholinrezeptoren und synthetisieren AcCh. Sie besitzen auch adrenerge Rezeptoren und immerhin eines der Enzyme (Dopamin-ß-Hydroxylase), die zur Synthese von Catecholaminen notwendig sind. Opioidrezeptoren sind ferner auf diesen Zellen vorhanden. Deshalb könnte es sein, daß in Analogie zum Acetylcholinsystem die Hybride auch Opioidpeptide synthetisieren. Erste Hinweise darauf wurden bereits von J. Traber erhalten (78). Er fand, daß bei Inkubation der Zellen mit PGE_1 und dem Opioidantagonisten Naloxon der cyclo AMP-Spiegel manchmal signifikant erhöht war gegenüber dem Kontrollwert mit PGE_1 allein. Werden Opioide

von den Zellen ins Medium abgegeben, so können sie an die Opioidrezeptoren binden und so den durch PGE_1 hervorgerufenen Anstieg des cyclo AMP-Spiegels hemmen. Naloxon würde die Opioide vom Rezeptor verdrängen und deshalb einen höheren cyclo AMP-Spiegel bedingen. Im Gegensatz dazu wurde von G. Giagnoni et al. (79) berichtet, daß in den Hybridzellen 108CC15 keine Opioidaktivität nachzuweisen sei.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen,

1.) ob die Hybridzellen 108CC15 endogene Opioidpeptide synthetisieren und, wenn ja, welche;

2.) wie der Gehalt an diesen Peptiden reguliert wird;

3.) wie die Biosynthese dieser Opioidpeptide verläuft;

4.) ob in den Hybridzellen auch noch andere, Nichtopioid-Faktoren vorhanden sind, die die Aktivität der Adenylatcyclase regulieren können.

B. ERGEBNISSE

I. Entwicklung und Beschreibung von Testsystemen zur Bestimmung von Opioidaktivität

Um die Anreicherung von Opioiden aus Zellextrakten verfolgen zu können, sind Testsysteme notwendig. Die Anforderungen, die an einen solchen Test gestellt werden, sind:

a.) hohe Spezifität;

b.) hohe Sensitivität;

c.) hohe Reproduzierbarkeit;

d.) schnelle Durchführbarkeit;

e.) niedrige Kosten.

Im folgenden sollen drei Testsysteme beschrieben werden, die (zum Teil nach Modifikationen) obige Kriterien erfüllen.

Cyclisches Adenosinmonophosphat ist ein ubiquitärer, intrazellulärer Botenstoff (second messenger) für extrazellulär wirkende Hormone. Es wird durch das hormonsensitive Enzym Adenylatcyclase aus ATP gebildet (80). Auch Prostaglandine bedienen sich des cyclischen AMP als Mediator manch ihrer Wirkungen, auch im Gehirn (81). In den Hybridzellen wird der cyclo AMP-Spiegel durch PGE_1 stark erhöht (78, 82). Opiode unterdrücken diese Erhöhung (Übersichtsartikel 76). Gleichzeitig anwesender Opioidantagonist Naloxon hemmt

den Opioideffekt. Hemmung der Adenylatcyclase durch Opioide und Aufhebung des hemmenden Effekts durch Naloxon kann als spezifischer biologischer Test für Opioide benutzt werden.

Die Hybridzellen können auch für Opioidrezeptorbindungsstudien verwendet werden (83, 84). Opioide konkurrieren mit radioaktiv markiertem Opioid um die Bindungsstellen der Zellen. Auch diese Methode kann als Indikatorsystem für die Anwesenheit von Opioiden in Extrakten verwendet werden.

Als dritte Meßmethode wurde ein Radioimmunotest (RIA) benutzt. Das Antiserum wurde gegen Leu-Enkephalin in einem Kaninchen erzeugt (85).

Zunächst wird versucht, mit diesen Testsystemen bereits Bekanntes zu bestätigen. Anschließend werden die Wirksamkeiten einiger neuer Opioidpeptide untersucht und die Tests für die Suche nach endogenen Opioiden in Zellextrakten verwendet. Zu diesem Zweck muß zum Teil die Sensitivität der Tests vorher gesteigert werden.

I.1. Entwicklung eines Meß-Systems für cyclo AMP mit erhöhter Sensitivität

I. 1.1. Vorbemerkung und Vorversuche

Zur Bestimmung des Einflusses von Hormonen auf den cyclo AMP-Spiegel in Hybridzellen wird zunächst die von J. Traber

beschriebene Methode (78, 86) benützt. Die Zellen werden dafür in Kulturschalen mit 85 mm Durchmesser gezüchtet. Das Inkubationsvolumen beträgt 5 ml (Details siehe Ref. 78, 86). Abb. 5 zeigt die durch Leu-Enkephalin (Kurve a) sowie durch einen Hybridzellextrakt (Kurve b) verursachte Hemmung des durch PGE_1 hervorgerufenen Anstiegs des cyclo AMP-Spiegels.

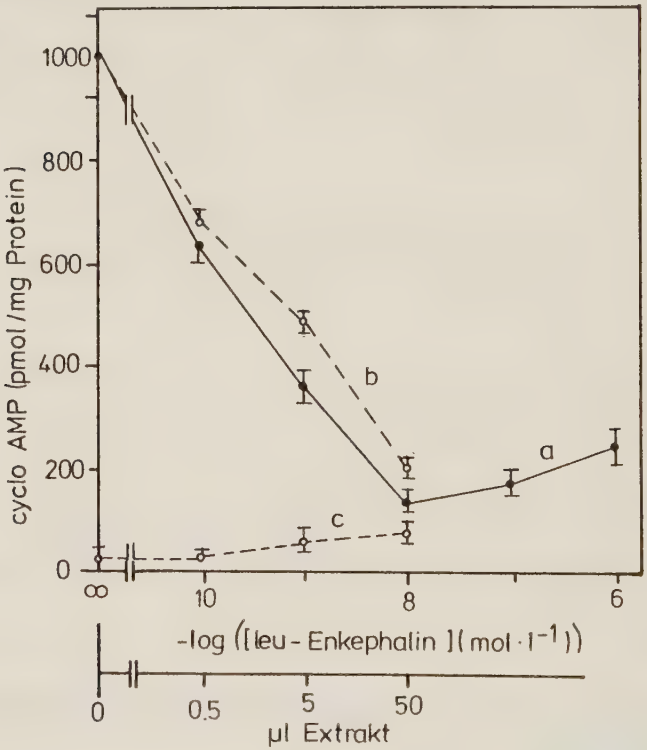


Abb. 5. Abhängigkeit des cyclo AMP-Spiegels in Hybridzellen von der Leu-Enkephalinkonzentration (Kurve a) und der Menge zugesetzten Hybridzellextraktes (Kurve b, c) in Gegenwart (Kurve b) und Abwesenheit (Kurve c) von PGE_1. 1.4×10^6 lebende Zellen pro Platte (77 % Lebensfähigkeit, P 13). Die Zellen werden 10 min. bei 37° C inkubiert, anschließend extrahiert und das intrazelluläre cyclo AMP bestimmt. Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, wurden alle folgenden cyclo AMP-Versuche unter diesen Bedingungen durchgeführt.

Ca. 2.4 x 10^8 Hybridzellen (P 15) aus 30 Petrischalen (145 mm Durchmesser) wurden mit AcOH extrahiert. 5 µl Extrakt stammen aus 0.8 x 10^6 Zellen. Zellen, die für Extrakte benötigt werden, werden für alle Experimente in Petrischalen mit 145 mm Durchmesser gezüchtet. Von einer Replica-Platte wird der Proteingehalt bestimmt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß 1 mg Protein etwa 1 x 10^6 Zellen entspricht, errechnet sich aus dem Gesamtproteinwert die Zahl der Zellen, aus der der Extrakt gewonnen wurde.

Die für Leu-Enkephalin erhaltene Kurve entspricht der von M. Brandt beschriebenen (87). Der Hybridzellextrakt hemmt stark die hormonell stimulierte Adenylatcyclase, nicht aber die Basalaktivität (Kurve c). Da neben Opioiden auch Acetylcholin, Somatostatin und Noradrenalin die Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels durch PGE_1 verhindern (78, 88), könnte die durch den Zellextrakt bedingte Hemmung über verschiedene Rezeptoren erfolgen. Atropin als muskarinisch-cholinerger Antagonist und Naloxon als Opioidantagonist heben den Effekt von AcCh bzw. Opioid auf (78). Wenn die Hemmung durch Extrakt über einen der genannten Rezeptoren erfolgt, sollte Zugabe entsprechender Antagonisten die Hemmung aufheben. Da für Somatostatin kein solcher existiert und die Gegenwart adrenerger Agonisten im Extrakt wegen fehlender Tyrosinhydroxylase in den Hybridzellen unwahrscheinlich ist, wurde nur der Effekt eines cholinergen Antagonisten und eines Opioidantagonisten auf die Extraktwirkung getestet. Tab. 1 zeigt, daß die Hemmung durch Extrakt von Antagonisten nicht beeinflußt wird.

Tab. 1. Kein Einfluß von Atropin und Naloxon auf die Wirkung von Hybridzellextrakt.

Exp I			Exp II		
PGE_1 (0.3 µM)	Zugabe (µM)	cyclo AMP (pmol/mg Protein)	PGE_1 (0.3 µM)	Zugabe (µM)	cyclo AMP (pmol/mg Protein)
-	-	30 ± 15	-	-	11 ± 3
-	Nx (100)	19 ± 3	-	Atropin (1)	9 ± 1
+	-	1010 ± 80	+	-	458 ± 67
+	Extrakt 5 µl	490 ± 30	+	Extrakt 5 µl	243 ± 32
+	Extrakt 50 µl	210 ± 20	+	Extrakt 50 µl	99 ± 22
+	Nx	1280 ± 200	+	Atropin	440 ± 49
+	Extrakt 5 µl+Nx	461 ± 65	+	Extrakt 5 µl+Atropin	316 ± 99
+	Extrakt 50 µl+Nx	241 ± 30	+	Extrakt 50 µl+Atropin	123 ± 4
+	Leu-Enk (0.1)	180 ± 20	+	AcCh (1)	48 ± 7
+	Leu-Enk + Nx	1280 ± 155	+	AcCh + Atropin	546 ± 244

Exp. I: 1.4×10^6 lebende Zellen pro Platte (77 % Lebensfähigkeit, P 13).

Exp. II: 1.5×10^6 lebende Zellen pro Platte (77 % Lebensfähigkeit, P 12).

Extrakt siehe Legende zu Abb. 5. Nx = Naloxon.

Wenn Opioide an der durch den Extrakt ausgelösten Absenkung des cyclo AMP-Spiegels beteiligt sind, dann nur in so geringem Maße, daß eine Aufhebung des Hemmeffekts durch Naloxon von anderen Substanzen überkompensiert wird.

Zur gleichen Aussage führen Versuche, die hemmenden Substanzen durch Proteasenbehandlung zu zerstören. Tab. 2 zeigt, daß keine der getesteten proteolytischen Enzyme die Hemmaktivität mindert. In den Extrakten scheinen folglich die Adenylatcyclase hemmende Substanzen zugegen zu sein, die nicht aus Aminosäuren aufgebaut sind. Selbst 24-stündige Behandlung mit Proteasen verminderte die Aktivität nicht.

Tab. 2. Hemmwirkung von Hybridzellextrakt nach Proteasenbehandlung.

PGE_1 (0.3 uM)	Enzym	cyclo AMP (pmol/mg Protein) nach Zugabe von Extrakt (50 ul)	Leu-Enkephalin (50pmol)
-	-	-	10 ± 6	-
+	-	-	441 ± 140	-
+	-	137 ± 13	108 ± 22
+	Chymotrypsin	90 ± 25	272 ± 44
+	Trypsin	95 ± 11	109 ± 68
+	CPA	120 ± 23	422 ± 51
+	Pronase	105 ± 22	557 ± 87
+	Hyaluronidase	104 ± 12	nicht gemessen

1.96 x 10^6 lebende Zellen pro Platte (84 % Lebensfähigkeit, P 18). Extrakt aus Hybridzellen (entsprechend 672 mg Hybridzellprotein, P 13, 84 Petrischalen); 5 µl entsprechen 0.8 x 10^6 extrahierten Zellen. Die Enzymkonzentration je Vorinkubations-Ansatz war 1.3 mg/ml, bei Carboxypeptidase A (CPA) 1.7 U/ml. Vorinkubation: 1 h, 37° C. Als positive Kontrolle für die Aktivität von Chymotrypsin, Pronase und CPA diente Leu-Enkephalin.

Glioma-Zellen C6-BU-1 besitzen keine Opioidrezeptoren (83, 89). Wenn die Hemmung durch Extrakt über Opioidrezeptoren vermittelt wird, sollte kein Effekt auf den cyclo AMP-Spiegel von C6-BU-1-Zellen zu beobachten sein. Tab. 3 zeigt, daß das Gegenteil der Fall ist.

Tab. 3. Wirkung von Hybridzellextrakt auf den cyclo AMP-Spiegel von Gliomazellen C6-BU-1

NA (100 µM)	Extrakt (µl)	cyclo AMP (pmol/mg Protein)
-	-	2 ± 1
+	-	2630 ± 300
+	0.5	2200 ± 300
+	5	2020 ± 100
+	50	933 ± 97

7.1 x 10^6 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 99 %, P 28). Extrakt aus ca. 3 x 10^8 Hybridzellen (P 18, 60 Petrischalen; 5 µl entsprechen 0.6 x 10^6 extrahierten Zellen. Der cyclo AMP- Spiegel wurde durch 100 µM NA erhöht. Dies gilt für alle weiteren cyclo AMP-Versuche mit C6-BU-1 Gliomazellen.

Adenosin erhöht in den Hybridzellen den cyclo AMP-Gehalt (78). Diese Erhöhung wird wie bei PGE_1 durch Opioide unterdrückt (78, 87, 90). Es war zu vermuten, daß Hybridzellextrakt ebenfalls einen Effekt auf die Adenosinwirkung hat. Dies wird auch beobachtet (Tab. 4). Die Erniedrigung des intrazellulären cyclo AMP-Gehalts in Gegenwart von PGE_1 wird also wahrscheinlich nicht durch eine Blockade des PGE_1-Rezeptors herbeigeführt.

Tab. 4. Wirkung von Hybridzellextrakt auf den durch Adenosin erhöhten cyclo AMP-Gehalt

Zugabe (/uM)	cyclo AMP (pmol/mg Protein)
-	15 ± 3
Adenosin (100)	129 ± 15
Adenosin + Leu-Enkephalin (0.1)	33 ± 1
Adenosin + Extrakt 5 /ul	104 ± 6
Adenosin + Extrakt 50 /ul	26 ± 9

4×10^6 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 93 %, P 18). Extrakt aus ca. 3.3×10^8 Zellen (P 16, 60 Petrischalen); 5 /ul entsprechen 0.6×10^6 Zellen.

Die Zellen werden durch Inkubation mit Hybridzellextrakt nicht irreversibel geschädigt. Vorinkubation (10 min) mit Extrakt bzw. Puffer ergibt nach Waschen und Hauptinkubation (10 min) mit PGE_1 den gleichen cyclo AMP-Wert (Tab. 5). Daraus kann gefolgert werden, daß die im Extrakt enthaltenen

aktiven Substanzen extrazellulär wahrscheinlich über spezifische Rezeptoren die Aktivität der Adenylatcyclase in reversibler Weise beeinflussen.

Tab. 5. Einfluß der Vorinkubation von Hybridzellen mit Extrakt auf den cyclo AMP-Gehalt nach Inkubation mit PGE_1

Zugabe	cyclo AMP (pmol/mg Protein)
-	34 ± 11
PGE_1 0.3 /uM	867 ± 174
PGE_1 + Extrakt 30 /ul	197 ± 32
PGE_1 nach Vorinkubation mit Puffer	1296 ± 126
PGE_1 nach Vorinkubation mit 30 /ul Extrakt	1426 ± 66

0.8×10^6 lebende Zellen in Platten mit 60 mm Durchmesser (Lebensfähigkeit 90 %, P 17). Inkubationsvolumen 3 ml. Extrakt aus ca. 2.4×10^8 Zellen, P 16, 47 Petrischalen); 30 /ul entsprechen 5×10^6 extrahierten Zellen. Vor- und Hauptinkubation jeweils 10 min bei 37° C. Dazwischen wurde der Zellrasen 1 x mit 3 ml Inkubationsmedium gewaschen.

Aus den bisher beschriebenen Versuchen wird deutlich, daß möglicherweise mehrere Substanzen in den Extrakten enthalten sind, die den cyclo AMP-Spiegel regulieren können. Deshalb ist es notwendig, die Extrakte zwecks weiterer Charakterisierung zu reinigen. Zunächst wurde eine Auftrennung mittels

Gelchromatographie versucht. Dazu wurde Biogel P 4 gewählt, da es mit einem Ausschlußmolekulargewicht von ca. 4000 für die Auftrennung kleinerer Moleküle geeignet erschien und zudem chemisch und gegen Mikroorganismen stabiler ist als entsprechendes Sephadexmaterial. Ein typisches UV-Extinktionsdiagramm eines Trennlaufes mit Hybridzellextrakt zeigt Abb. 6.

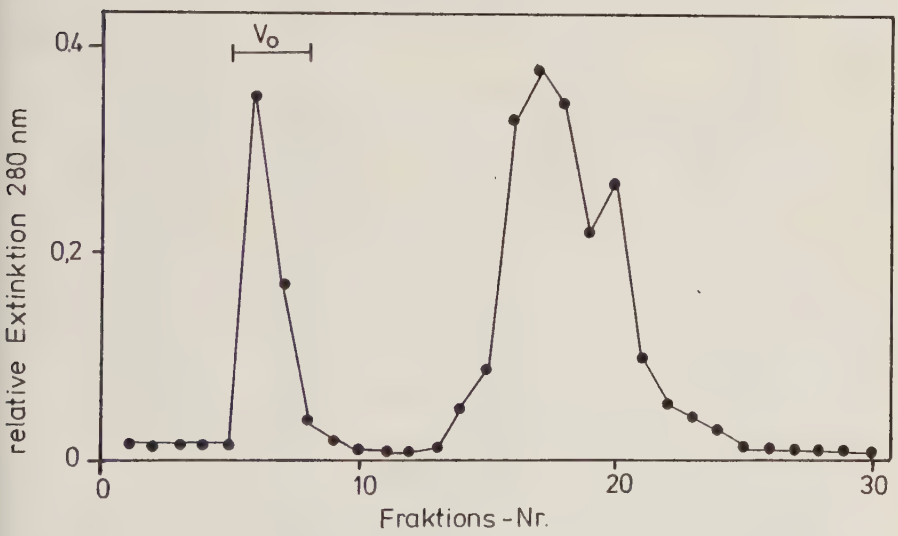


Abb. 6. Verfolgung der Trennung eines Hybridzellextraktes auf einer Biogel P 4-Säule mittels Messung der Extinktion bei 280 nm.

Säule: 54 x 2 cm. Elutionsgeschwindigkeit 18 ml/h. Elutionsmittel 0.1 M AcOH. Fraktionsgröße 9 ml. Auftrag: Extrakt aus ca. 2.8 x 10^8 Zellen (P 16, 30 Petrischalen). Das Ausschlußvolumen Vo wurde mit Dextranblau bestimmt.

Entsprechend den Extinktionsgipfeln wurden die Fraktionen vereinigt, lyophilisiert, in 200 µl Puffer aufgenommen und getestet. Starke Absenkung des cyclo AMP-Spiegels wurde nur in den vereinigten Fraktionen 16 - 18 beobachtet.

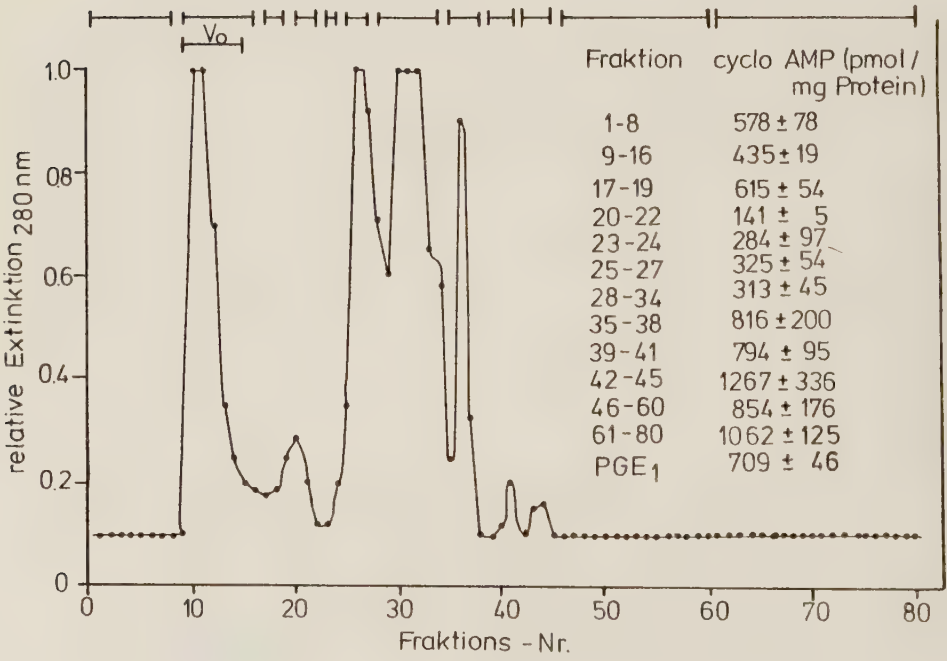


Abb. 7. Verfolgung der Trennung eines Hybridzellextrakts auf einer Biogel P 4-Säule (100 x 2 cm) mittels Absorption bei 280 nm. Elutionsgeschwindigkeit 48 ml/h, 0.1 M AcOH. Fraktionsgröße 10 ml. Auftrag: Extrakt aus ca. 4 x 10^8 Zellen (P 20, 47 Petrischalen).

Fraktionen wurden entsprechend den Balken vereinigt, lyophilisiert, in 200 µl Puffer aufgenommen und auf ihre Fähigkeit getestet, die durch PGE_1-stimulierte cyclo AMP-Bildung zu hemmen.
9.4 x 10^5 lebende Zellen pro Platte (Lebensfähigkeit 85 %, P 18).

Um die Auftrennung zu verbessern, wurde die Säulenlänge verdoppelt. Ein typisches UV-Diagramm einer Auftrennung darüber zeigt Abb. 7. Vereinigte Fraktionen wurden lyophilisiert, aufgenommen und getestet. Die erhaltenen cyclo-AMP-Werte sind in das Diagramm eingetragen. Man sieht, daß nach Benützung der längeren Säule mehrere aktive Fraktionen erhalten wurden (9 - 16, 20 - 34).

Aufgrund dieser vorläufigen Versuche zur Reinigung der Extrakte war es klar, daß noch weitere Reinigungsschritte nötig sind, um Einzelsubstanzen zu isolieren und zu charakterisieren. Bei den bislang benützten Versuchsbedingungen nach Traber (78, 86) wird aber bei 5 ml Inkubationsvolumen (für 85 mm Platten) bzw. 3 ml (für 60 mm Platten) soviel Material zum Testen verbraucht, daß es unmöglich ist, Anreicherungsschritte zu verfolgen. Außerdem ist es wünschenswert, Einzelfraktionen von Säulenläufen testen zu können, ohne dazu die ganze Fraktion einsetzen zu müssen. Deshalb war die Entwicklung einer sensitiveren Methode zur Bestimmung der Wirkung von Hormonen und Drogen auf den intrazellulären cyclo AMP-Spiegel eine unabdingbare Voraussetzung für weitere Untersuchungen.

Durch Verkleinerung des Inkubationsvolumens kann sowohl höhere Sensitivität (mit gleicher Menge wie früher wird eine größere Konzentration erzielt) als auch Materialersparnis (gleiche Konzentration wie früher mit weniger Material) erreicht werden. Die Sensitivität des Tests zur

Bestimmung des gebildeten cyclo AMP setzt der Verkleinerung aber Grenzen. Die Verwendung von Gewebekulturschalen mit 24 Vertiefungen von 16 mm Durchmesser hat sich als optimal erwiesen (fortan Multiplatten genannt). Das Inkubationsvolumen kann um den Faktor 10 gegenüber 60 mm-Platten auf 300 µl gesenkt werden. Schnellere Durchführbarkeit des Versuchs und niedrigere Materialkosten sind angenehme Begleiterscheinungen. Gleichzeitig wurde die von Traber und Brandt (78, 91) beschriebene cyclo AMP-Bestimmungsmethode weiter modifiziert. Details sind im Experimentellen Teil (S. 200 ff) beschrieben.

Einpipettieren von 37° C warmem Inkubationsmedium und Zusätzen in jede Vertiefung würde zu unterschiedlich langen Inkubationszeiten führen. Da die meisten biologischen Prozesse bei 0° C stark verlangsamt sind, wurde versucht, die Zellen abzukühlen, Medium und Zusätze kalt einzupipettieren und die Inkubationen in allen Vertiefungen durch Erwärmung gleichzeitig zu starten. Vor Versuchen mit Zellen wurden anhand von Temperaturmessungen Wasch- und Inkubationsbedingungen ermittelt.

I. 1.2. Temperaturmessungen in 24-Behälter-Gewebekulturplatten

Eiskaltes, Hepes-gepuffertes Inkubationsmedium wird in eine Vertiefung pipettiert, auf dessen Boden sich ein Thermistor befindet. Die Multiplatte wird in eine Eis-Wasser-Mischung gestellt, bis die Temperatur des Mediums in der Vertiefung 4 - 5° C erreicht hat. Anschließend wird die Platte in ein

Wasserbad bestimmter Temperatur gestellt und die Erwärmung verfolgt. Die Erwärmungskurven für verschiedene Temperaturen sind in Abb. 8 zu sehen.

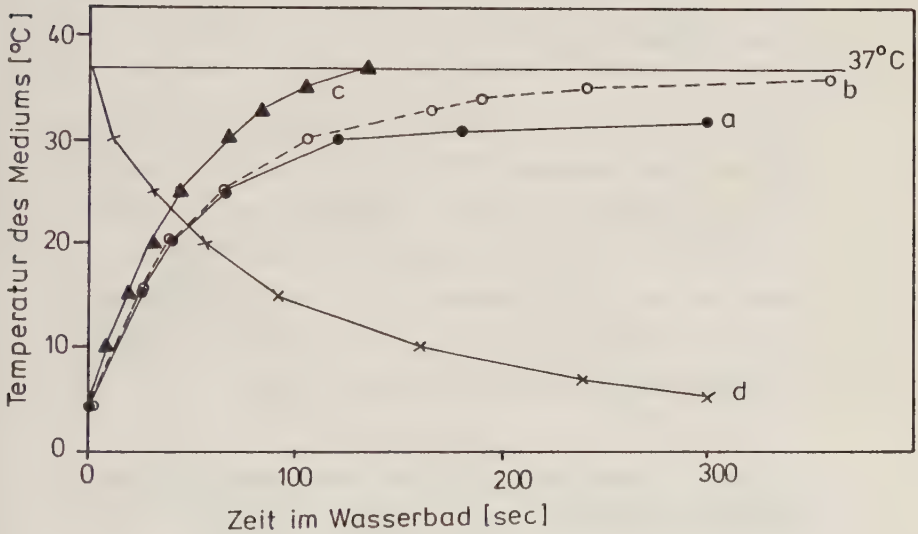


Abb. 8. Erwärmungs- bzw. Abkühlungskurven in Multiplatten in Wasserbädern verschiedener Temperatur.
300 µl eiskaltes DMEM/Hepes wurden in eine Vertiefung pipettiert, die Platte auf 4° C abgekühlt und ins warme Wasserbad gestellt. Wasserbadtemperaturen waren: 37° C (Kurve a), 40° C (Kurve b), 44° C (Kurve c). Bei Kurve d wurde eine 37° C warme Platte in ein 5° C kaltes Wasserbad gestellt.

Bei 37° C Wasserbadtemperatur erwärmt sich der Boden der Vertiefung auch nach 15 min nur auf 34° C. Um nach wenigen Minuten 37° C zu erreichen, ist eine Wasserbadtemperatur von 40° C erforderlich. Die Begründung dafür, daß trotzdem routinemäßig bei 37° C Wasserbadtemperatur inkubiert

wurde, findet sich im nächsten Kapitel (S. 29). Einmaliges Waschen der 37° C warmen Multiplatte mit 500 µl und Zugabe von 300 µl eiskaltem Medium kühlen den Boden der Platte auf 4 - 5° C ab. In allen folgenden Versuchen wurde daher mit eiskaltem Medium gewaschen und eiskaltes Inkubationsmedium zugegeben.

Zur Beendigung einer Inkubation mit Zellen sollte die Platte möglichst rasch abgekühlt und die Zellen durch Zugabe von Trichloressigsäure bzw. Ethanol aufgeschlossen werden. Da die Abkühlung bei 5° C langsam verläuft (Abb. 8, Kurve d), werden in Zukunft die Platten bei ca. -50° C abgekühlt (Trockeneis/EtOH) und die Zellen durch rasche Zugabe von mit Trockeneis gekühltem EtOH aufgeschlossen.

I. 1.3. Einfluß der Erwärmung bei verschiedenen Temperaturen auf den cyclo AMP-Gehalt

Hybridzellen in Multiplatten wurden, wie oben beschrieben, abgekühlt und anschließend der zeitliche Verlauf der cyclo AMP-Akkumulation in Gegenwart von PGE_1 bestimmt. Abb. 9 zeigt, daß zu den gemessenen Zeiten die cyclo AMP-Werte nur geringfügig unterschieden sind.

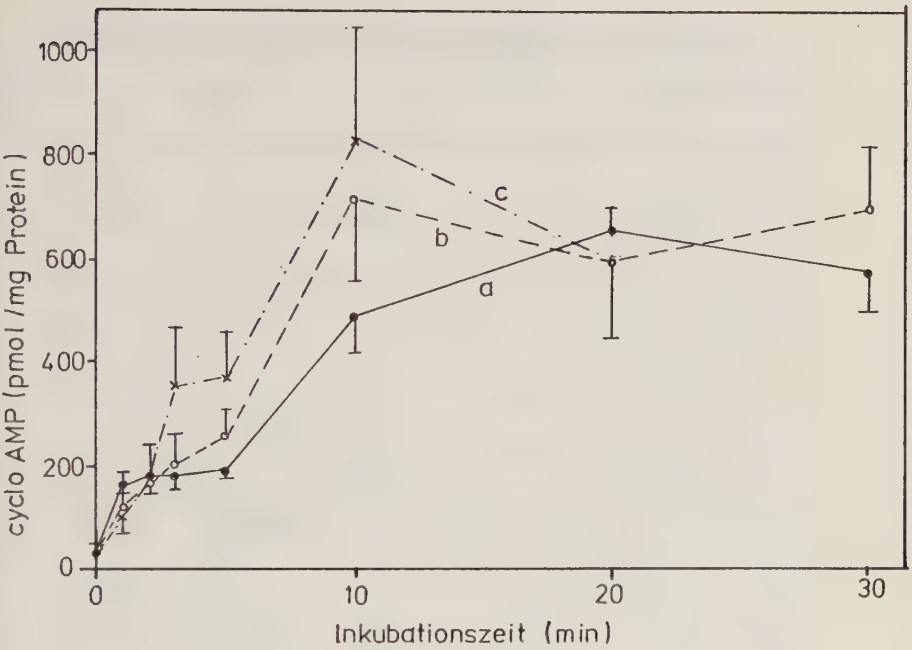


Abb. 9. Verlauf der cyclo AMP-Bildung bei verschiedenen Inkubationstemperaturen.

1.8×10^5 Zellen pro Vertiefung (89 % Lebensfähigkeit, P 21).

Die Zellen wurden mit eiskaltem Medium versetzt und im Wasserbad 10 min mit PGE_1 inkubiert bei: 39.5° C (Kurve a), 37° C (Kurve b) 2 min bei 44° C + 8 min bei 39.5° C (Kurve c). Nach der Inkubation wird das intrazelluläre cyclo AMP mit trockeneisgekühltem EtOH extrahiert und bestimmt. Bei allen weiteren cyclo AMP-Versuchen wird diese Methode angewendet.

Da Inkubation bei 37° C kaum niedrigere cyclo AMP-Werte erzeugt als bei höheren Temperaturen, wurden die weiteren Inkubationen der Einfachheit halber bei 37° C durchgeführt. In anderen Experimenten dieser Art wurde der maximale cyclo AMP-Wert spätestens nach 8 min Inkubation erreicht.

I. 1.4. Einfluß der Kultivationsdauer auf die Stimulierbarkeit durch PGE_1

In die Vertiefungen der Multiplatten können im Vergleich zu normalen Kulturschalen nur sehr wenige Zellen angesät werden. Deshalb ist der Ansä-Fehler möglicherweise größer als bei der Verwendung von Petrischalen. Durch ein höheres Inokulum an Zellen und eine damit verbundene kürzere Kultivationsdauer könnte der Fehler verkleinert werden. Bei der Subkultivierung wird (zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale) Trypsin verwendet. Trypsin greift auch Zelloberflächenproteine (z. B. Rezeptoren) an. Die Zellen brauchen Zeit, um diese Schäden zu beheben. Deshalb kann die Kulturdauer nicht beliebig verkürzt werden. Abb. 10 zeigt, daß erst nach einer Kulturdauer von 4 Tagen PGE_1 die Bildung von cyclo AMP gut stimulieren kann. Diese Kulturbedingung wurde bisher auch von Traber (78) und Brandt (87) benutzt.

Der geringe intrazelluläre cyclo AMP-Gehalt nach 1 oder 2 Tagen in Kultur beruht nicht auf erhöhter Ausscheidung ins Medium, wie man Abb. 10 (Kurve b) entnehmen kann. Wird das Experiment in der Weise durchgeführt, daß die Platten an verschiedenen Tagen angesät werden, der Versuch aber am selben Tag stattfindet, erhält man das gleiche Ergebnis wie in Abb. 10 (Daten nicht gezeigt). Opioide hemmen die Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels durch PGE_1. Die prozentuale Hemmung durch 10 nM Leu-Enkephalin ist

an allen Tagen nahezu gleich (Abb. 10, Kurve c).

Die Versuche mit Zellen in Multigewebekulturschalen werden in Zukunft 4 Tage nach Ansäen (Ansä-Tag nicht mitgerechnet) durchgeführt.

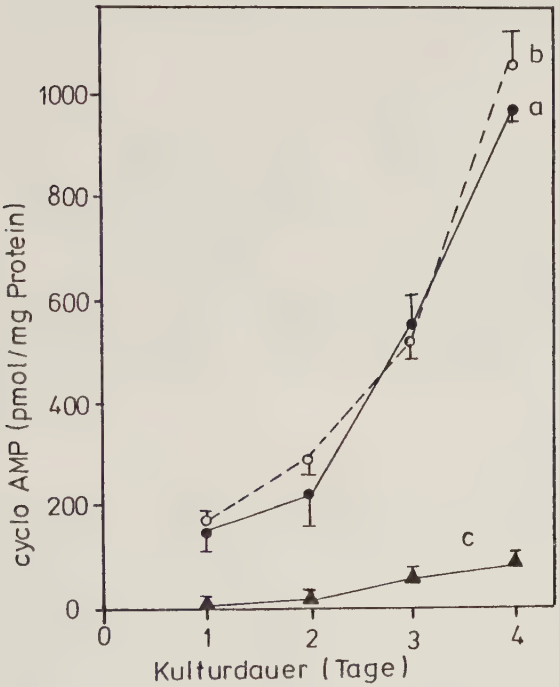


Abb. 10. Einfluß der Kulturdauer auf den durch Stimulation mit PGE_1 erreichbaren cyclo AMP-Gehalt von Hybridzellen.

Kurve a: intrazelluläres cyclo AMP nach PGE_1
Kurve b: intra- plus extrazelluläres cyclo AMP nach PGE_1
Kurve c: intrazelluläres cyclo AMP nach 10 nM Leu-Enkephalin + PGE_1

Alle Platten wurden zugleich mit unterschiedlicher Zellzahl angesät, die Inkubationen mit

Hormonen an je einem der folgenden Tage durchgeführt. Die Zelldichte war dann am Tag des Versuchs bei allen Platten gleich und betrug 1.4×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 90 - 95 %, P 16).

I. 1.5. Vergleich von cyclo AMP-Messungen an Hybridzellen in Petrischalen und 24-Behälter-Gewebekulturplatten

Um sicher zu gehen, daß die Mikromethode zuverlässige Werte liefert, wurden Vergleichsmessungen an Zellen in Petrischalen und Multiplatten durchgeführt. Abb. 11 zeigt den Anstieg des cyclo AMP-Gehaltes in Abhängigkeit von der PGE_1-Konzentration. Der Kurvenverlauf ist identisch, wenn auch die cyclo AMP-Werte, die von Zellen in Petrischalen erhalten wurden, meist etwas höher ausfallen.

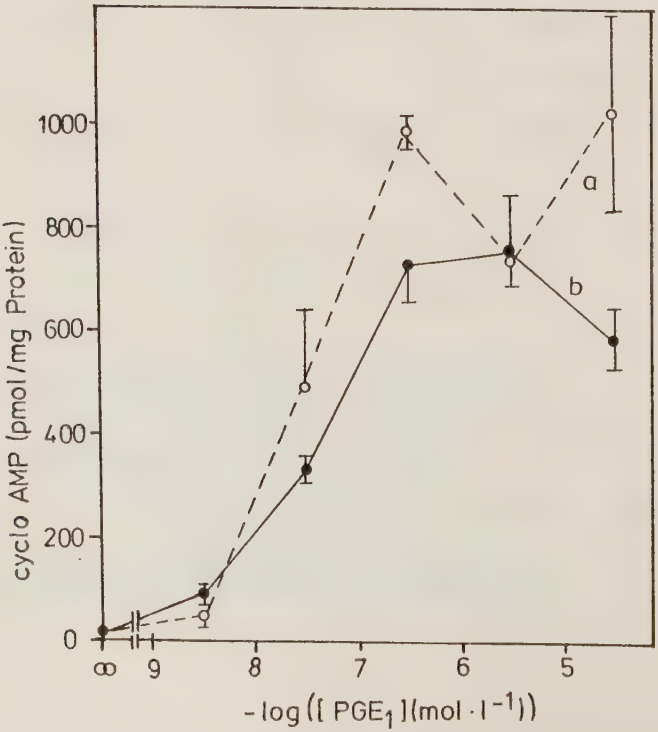


Abb. 11. Abhängigkeit der cyclo AMP-Akkumulation von der Konzentration an PGE_1 bei Zellen in Petrischalen (Kurve a) und Multiplatten (Kurve b).
1.3×10^6 lebende Zellen pro 60 mm-Petrischale (92 % Lebensfähigkeit, P 18)
1.7×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (86 % Lebensfähigkeit).

In beiden Fällen wird halbmaximale Erhöhung (EC_{50}) der cyclo AMP-Konzentration bei 30 nM, maximale bei 0.3 µM PGE_1 erreicht. Der Kurvenverlauf entspricht damit dem von J. Traber beschriebenen (78, 89). Gelegentlich schwanken die maximalen cyclo AMP-Spiegel allerdings von Experiment zu Experiment sehr stark (200 - 2000 pmol/mg Protein), wie auch bereits von J. Traber beobachtet wurde (78). Weitere Vergleichsmessungen sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6. Vergleich von cyclo AMP-Konzentrationen in Hybridzellen in Petrischalen und Multiplatten

Zugabe (µM)	cyclo AMP (pmol/mg Protein)	
	Petrischalen	Multiplatten
-	17 ± 3	17 ± 4
PGE_1 (0.3)	709 ± 46	722 ± 91
PGE_1 + Leu-Enkephalin (0.1)	96 ± 13	153 ± 28
PGE_1 + Morphin (10)	159 ± 11	365 ± 106
PGE_1 + Extrakt (5 µl)	162 ± 23	286 ± 9

9.4×10^5 lebende Zellen pro 60 mm Platte (85 % Lebensfähigkeit, P 18). 1.7×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (92 % Lebensfähigkeit, P 18). 5 µl Extrakt entsprechen 1×10^6 extrahierten Zellen (P 16).

Warum die Absenkung des cyclo AMP-Spiegels in den Zellen auf Multiplatten durch hemmende Hormone geringer ist als in Zellen auf Petrischalen, ist nicht klar. Allerdings werden gelegentlich Sensitivitätsschwankungen gegenüber Opioiden an den Hybridzellen beobachtet. Die Konzentrationen, bei denen maximale Hemmung erreicht wird, schwanken im Bereich einer Größenordnung. Mögliche Ursachen liegen im metabolischen Zustand der Zellen. Vor allem die intrazelluläre GTP-Konzentration könnte eine entscheidende Rolle spielen. Guanylnucleotide sind für die Regulation der Adenylatcyclaseaktivität essentiell (z. B. 92-94). Auch die Hemmung der Adenylatcyclase in Hybridzellen 108CC15 durch Opioide wird durch GTP reguliert (95, 96). Die Bindung von Opioiden an entsprechende Rezeptoren in Hybridzellmembranen unterliegt ebenfalls dem Einfluß von GTP (96, 97). Nur bei einer bestimmten intrazellulären GTP-Konzentration wird man einen optimalen Opioideffekt beobachten. Schwankungen in der GTP-Konzentration (z. B. durch unterschiedliche Erschöpfung des Wachstumsmediums bei unterschiedlicher Zelldichte) könnten so zu erhöhter oder erniedrigter Sensitivität gegenüber Opioiden führen.

Da mit Hybridzellen in Multiplatten prinzipiell gleiche Ergebnisse erhalten werden wie mit Zellen in Petrischalen, konnten alle weiteren Versuche mit der neuen Methode durchgeführt werden.

I. 1.6. Opioide hemmen die Bildung von cyclo AMP in Hybridzellen in 24-Behälter-Gewebekulturplatten

Wie bereits in Abb. 10 und Tab. 6 gezeigt, hemmen Leu-Enkephalin und Morphin den intrazellulären cyclo AMP-Anstieg in Gegenwart von PGE_1. Es war interessant zu sehen, ob auch andere, endogene Opioidpeptide über die Opioidrezeptoren der Hybridzellen wirken können. Abb. 12 zeigt die Abhängigkeit des cyclo AMP-Gehaltes der Zellen von der Konzentration verschiedener Opioidpeptide. Da die Daten aus zum Teil verschiedenen Experimenten gewonnen wurden, die maximalen cyclo AMP-Werte aber schwanken, sind wegen besserer Vergleichbarkeit der Ergebnisse die prozentualen Hemmungen des maximalen cyclo AMP-Wertes angegeben. Gleiches gilt für die meisten der folgenden cyclo AMP-Daten. Die Konzentrationen, bei denen halbmaximale Hemmung beobachtet wird (IC_{50}-Werte) sind bei Leu-Enkephalin und Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 (Abb. 12, Kurven a, b) 1 nM. Der Wert für Leu-Enkephalin entspricht dem von M. Brandt gefundenen (98). Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 ist im vorliegenden Fall genauso aktiv wie Leu-Enkephalin, im Rezeptorbindungstest an Hybridzellen dagegen 60 % weniger potent (99). Die IC_{50}-Werte für Met-Enkephalin-Arg^6, α-Neo-Endorphin (Abb. 12, Kurven c, d) und Dynorphin (Abb. 12, Kurve e) liegen bei 12 nM bzw. 13 nM. Leu-Enkephalin-Arg^6 hat einen IC_{50}-Wert von 2nM (nicht gezeigt). Met-Enkephalin-Arg^6 zeigt auch im Test am vas deferens der Maus nur ca. 4 % der Potenz von

Met-Enkephalin (40), während α-Neo-Endorphin im Meerschweinchen-Ileum-Test mehr als 20 mal so potent ist wie Leu-Enkephalin (37).

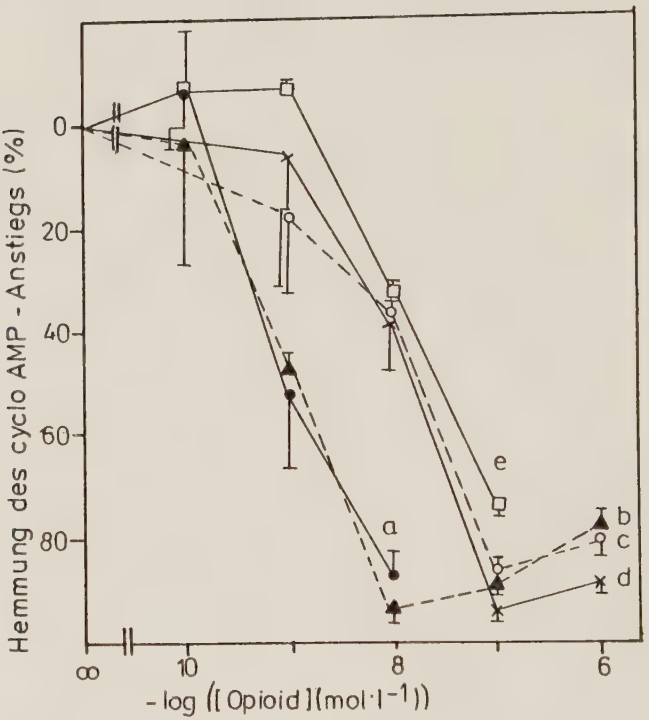


Abb. 12. Einfluß der Konzentration verschiedener Opioide auf den cyclo AMP-Gehalt von Hybridzellen.

0.83×10^5 Zellen pro Vertiefung (91 % Lebensfähigkeit, P 17) für Kurven a-c; 1.9×10^5 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 90 %, P 19) für Kurve d; 1.4×10^5 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 93 %, P 19) für Kurve e.

Maximaler cyclo AMP-Wert (pmol/mg Protein): 1172 ± 281 (Kurven a-c) bzw. 982 ± 63 (Kurve d) bzw. 420 ± 27 (Kurve e).
Leu-Enkephalin (Kurve a), Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 (Kurve b), Met-Enkephalin-Arg^6 (Kurve c), α-Neo-Endorphin (Kurve d), Dynorphin (Kurve e). Dynorphin wird nach Angaben von A. Goldstein (38) in 0,1 M HCl:Methanol = 1:1 (v/v) gelöst.

Dynorphin dagegen ist im Meerschweinchen-Ileum-Test das potenteste bisher bekannte Opioid (730 mal potenter als Leu-Enkephalin) (38). Im vas deferens der Maus ist es 3 mal potenter als Leu-Enkephalin (38). Im vas deferens der Maus überwiegen Opioidrezeptoren vom δ-Typ, im Meerschweinchen-Ileum vom μ-Typ (17). Die Hybridzellen 108CC15 besitzen soweit bekannt nur δ - oder Enkephalinrezeptoren (20, 100). Die Existenz unterschiedlicher Populationen von Opioidrezeptoren könnte die Aktivitätsunterschiede der verschiedenen Opioidpeptide im Vergleich zu Enkephalin erklären. Die Hemmaktivität aller in Abb. 12 getesteten Peptide wird durch den Opioidantagonisten Naloxon aufgehoben.

Proteolytische Spaltung von Casein (Milcheiweiß) liefert Peptide mit Opioidwirkung (101). Die Peptide sind ß-Casomorphin-(1-7) (H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OH) und ß-Casomorphin-(1-5). ß-Casomorphin-(1-5) ist etwa 10 mal potenter als ß-Casomorphin-(1-7) im Meerschweinchen-Ileum-Test (102). Können diese Peptide auf Hybridzellen wirken? ß-Casomorphin-(1-5) und das Bruchstück-(1-4) standen uns zur Verfügung. Abb. 13 zeigt, daß bis zu einer Konzentration von 1 μM keine Aktivität gefunden wird. Inzwischen wurde berichtet (102), daß ß-Casomorphin bevorzugt an μ-Rezeptoren bindet. Es zeigt in Bindungsstudien hohe Affinität zu den Opioidrezeptoren im Meerschweinchen-Ileum (μ-Rezeptoren). Die Affinität zu den δ-Rezeptoren der Hybridzellen ist gering.

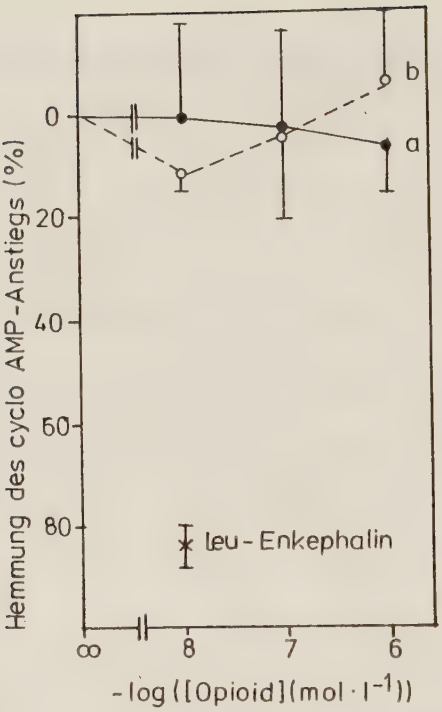


Abb. 13. Einfluß von ß-Casomorphin-(1-5) (Kurve a) und ß-Casomorphin-(1-4) (Kurve b) auf den cyclo AMP-Spiegel in Hybridzellen.

1.5×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (95 % Lebensfähigkeit, P 14); 1870 ± 60 pmol cyclo AMP/mg Protein maximal.

Signifikante Bindung wird erst ab einer Konzentration von 100 µM beobachtet (103). Die vorliegenden cyclo AMP-Daten stehen im Einklang mit diesen Befunden. Dem gegenüber stehen Ergebnisse von C. Zioudrou et al. (104). Pepsinhydrolysate von Weizengluten und α-Casein hemmen in durch Naloxon revertierbarer Weise die Adenylatcyclase in Homo-

genaten von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen, sowie die Kontraktionen im vas deferens der Maus. Da die aktiven Peptide noch nicht isoliert und sequenziert sind, kann über eine Verwandtschaft mit ß-Casomorphin oder Enkephalinen nichts gesagt werden. Die Peptide werden "Exorphine" genannt (105). Das Exorphin aus Weizengluten ist wesentlich aktiver als dasjenige aus Casein (104).

Kürzlich sind aus Froschhaut Opioidpeptide, Dermorphine genannt, isoliert und sequenziert worden (106). Dermorphin (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH_2) und Hyp^6-Dermorphin sind Heptapeptide mit natürlich vorkommendem D-Alanin in Position 2. Beide Peptide sind im Meerschweinchen-Ileum wesentlich potenter als die Enkephaline, in der Maus-vas deferens-Präparation sind sie etwa gleich aktiv (107). Beide Dermorphine sowie das L-Alanin-Analogon wurden synthetisiert (108). L-Ala^2-Dermorphin zeigt in beiden oben genannten biologischen Tests weniger als 0.1 % der Aktivität von Dermorphin. Es stellte sich die Frage, ob die beiden Dermorphine sowie L-Ala^2-Dermorphin trotz der von Enkephalin stark verschiedenen Aminosäuresequenz an Hybridzellen wirken können. In Abb. 14 sieht man, daß die D-Ala^2-Dermorphine aktiv sind.

Im Vergleich zu Leu-Enkephalin (IC_{50} 1nM) sind sowohl Dermorphin (IC_{50} 0.1 /uM, Abb. 14 A, Kurve a) als auch Hyp^6-Dermorphin (IC_{50} 0.3 /uM, Abb. 14 B, Kurve a) im Hybridzellsystem wesentlich weniger potent.

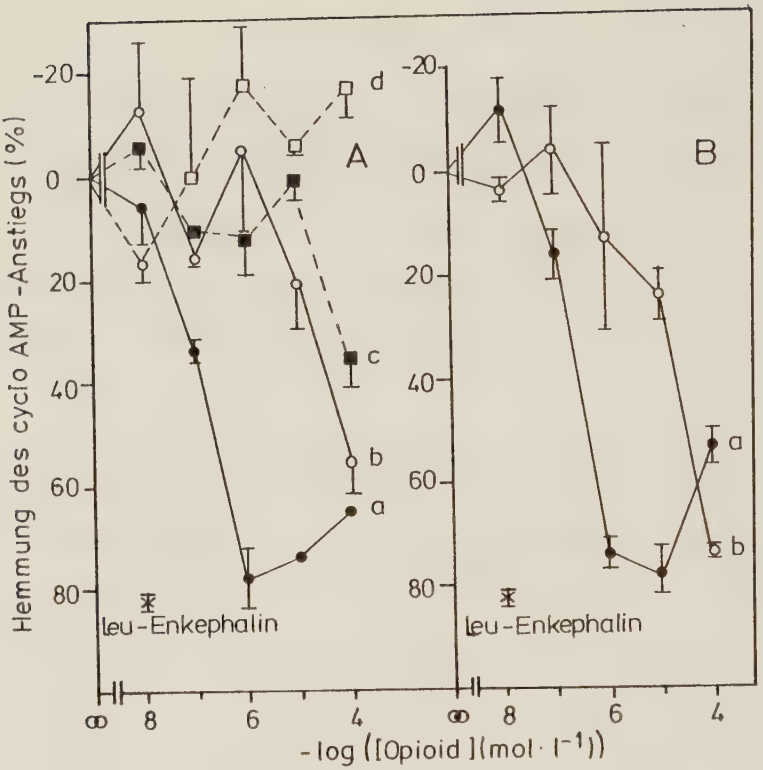


Abb. 14. Einfluß der Konzentration von Dermorphinen auf den cyclo AMP-Gehalt von Hybridzellen in An- und Abwesenheit von Naloxon.

1.3×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (86 % Lebensfähigkeit, P 17, 1110 ± 70 pmol cyclo AMP/mg Protein maximal).

A: Dermorphin ohne (Kurve a) und mit (Kurve b) 10 µM Naloxon. L-Ala^2-Dermorphin ohne (Kurve c) und mit (Kurve d) 10 µM Naloxon.

B: Hyp^6-Dermorphin ohne (Kurve a) und mit (Kurve b) 10 µM Naloxon.

L-Ala^2-Dermorphin zeigt nur bei einer Konzentration von 100 µM signifikante Hemmwirkung (Abb. 14 A, Kurve c). In Gegenwart des Opioidantagonisten Naloxon sind die Dosis-

Wirkungskurven von Dermorphin (Abb. 14 A, Kurve b) und Hyp^6-Dermorphin (Abb. 14 B, Kurve b) nach rechts verschoben. Auch die von L-Ala^2-Dermorphin bewirkte Hemmung wird durch Naloxon aufgehoben (Abb. 14 A, Kurve d). Es wurde noch untersucht, ob L-Ala^2-Dermorphin als Opioidantagonist wirkt. In Gegenwart von 1 µM L-Ala^2-Dermorphin sollte die Wirkung von 10 nM Leu-Enkephalin geschwächt werden. Dies ist nicht der Fall.

Die Opioidpeptide aus Froschhaut können also auch an die Opioidrezeptoren von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen binden und biologisch wirksam sein. Für diese Wirksamkeit ist der D-Alanin-Rest in Position 2 unbedingt erforderlich. Ob der Effekt von L-Ala^2-Dermorphin auf Eigenaktivität beruht oder ob Verunreinigung der Substanz mit D-Ala^2-Dermorphin dafür verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt. Weniger als 0.1 % Prozent Verunreinigung wären ausreichend, den Effekt von L-Ala^2-Dermorphin zu erzielen. Der große Aktivitätsunterschied zwischen D-Ala^2- und L-Ala^2-Dermorphin ist insofern überraschend, als die entsprechenden D-Ala^2- und L-Ala^2-Leu-Enkephaline gleich aktiv sind.

Ähnlich wie bei α-Neo-Endorphin (Kap. I. 1.6) können die im Vergleich zu Enkephalin unterschiedlichen Wirksamkeiten von Dermorphin und Hyp^6-Dermorphin im Meerschweinchen-Ileum und im Hybridzellsystem durch unterschiedliche Rezeptorpopulation bedingt sein. Bei Erhöhung der Konzen-

tration über die maximal wirksame steigt der cyclo AMP-Spiegel wieder an. Dies wurde auch für Morphin (78, 109), Leu-Enkephalin (87, 98) und eine Reihe weiterer Opioidpeptide (siehe Abb. 12) beobachtet. Eine gesicherte Erklärung für diesen Wiederanstieg steht noch aus. Eine mögliche Erklärung wäre, eine gemischte Agonist-Antagonist-Wirkung mit schwachem Antagonistenanteil anzunehmen. Der antagonistische Effekt würde erst bei hohen Konzentrationen zum Tragen kommen.

In Kapitel I. 2.5. (S. 54) wird gezeigt, daß die Dermorphine mit ^{3}H-Leu-Enkephalin um die Bindungsstellen in Hybridzellmembranen konkurrieren. Dadurch werden die oben dargelegten Befunde (Regulation des cyclo AMP-Gehalts durch Dermorphine über Opioidrezeptoren) erhärtet.

I. 2. Beschreibung eines Meß-Systems für die Bindung von Opioiden an Hybridzellrezeptoren

I. 2.1. Vorbemerkung

Im vorangegangenen Kapitel wurde dargelegt, wie über eine komplexe biologische Reaktionsfolge in Hybridzellen (Regulation des cyclo AMP-Gehalts durch Opioide) Opioidpeptide getestet werden können. Der erste Schritt in dieser Reaktionsfolge ist die Bindung des Opioids an den Rezeptor. Rezeptorbindungsstudien sind eine direktere Methode, An- oder Abwesenheit von Opioiden in Extrakten zu untersuchen.

Die Entwicklung radioaktiver Liganden mit hoher spezifischer Radioaktivität sind Voraussetzung für Bindungsexperimente. Goldstein et al. (110) definierten die Kriterien, um zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung zu unterscheiden. Als unspezifische Bindung (UB) bezeichnet man die Bindung von radioaktivem Liganden an andere Zellstrukturen als die Rezeptoren. In Gegenwart eines großen Überschusses ($\gg$ 1000fach) an nichtmarkierten Liganden kann sie quantitativ erfaßt werden. Dabei geht man von der Annahme aus, daß die Zahl der unspezifischen Bindungsstellen sehr viel größer ist als die Zahl der Rezeptoren, d. h. im experimentell zugänglichen Bereich nicht sättigbar ist. Durch die große Verdünnung der spezifischen Radioaktivität durch den "kalten" Liganden wird wegen der geringen Rezeptorenzahl die Bindung radioaktiver Moleküle an Rezeptoren sehr unwahrscheinlich. Das gleiche sollte auch für die unspezifische Bindung gelten. Da diese durch die Konzentrationserhöhung aber größer wird, heben sich die Effekte von Isotopenverdünnung und Konzentrationssteigerung gerade auf. Die unter diesen Bedingungen gebundene Radioaktivität ist also ein Maß für die unspezifische Bindung. Subtrahiert man den Betrag von der Gesamtbindung (spezifische + unspezifische, GB) erhält man die spezifische Bindung (SB). Die so ermittelte spezifische Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor muß sechs Kriterien erfüllen:

1.) Stereospezifität.

Von einem Enantiomerenpaar bindet nur eines bei physiologischen Konzentrationen (z. B. Opiate der L-Reihe).

2.) Sättigbarkeit.

Die Zahl der Rezeptoren auf einer Zelle ist begrenzt. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor ist mit einer diskreten Bindungskonstante beschreibbar.

3.) Gewebsspezifität.

Wird ein Hormon von den Zellen eines Gewebes nicht gebunden, sollte es dort auch keine Wirkung ausüben.

4.) Hohe Affinität des Liganden für den Rezeptor.

Wegen der geringen Konzentrationen, bei denen Hormone wirken, sind hohe Bindungskonstanten notwendig. Die Dissoziationskonstanten (= reziproke Bindungskonstanten) liegen im Bereich von 0.1 - 10 nM.

5.) Reversibilität.

Wäre die Bindung eines natürlichen Hormones nicht reversibel, wäre weitere Informationsübertragung durch Hormone und zelluläre Regulation blockiert. Aus experimentellen Gründen können auch spezifische, kovalent bindende Liganden verwendet werden.

6.) Übereinstimmung mit pharmakologischen Daten.

Die Affinitäten verschiedener Liganden zu dem entsprechenden Rezeptor sollen mit den pharmakologischen Wirksamkeiten dieser Liganden korrelierbar sein.

Wenn die experimentell bestimmte Bindung eines Liganden diese Bedingungen erfüllt, kann sie unter Beachtung gewisser Kontrollen als spezifisch betrachtet werden.

Manche Liganden binden nämlich mit hoher Spezifität an Materialien, die bei Bindungsstudien verwendet werden. Beispiele sind die Bindung von ^{3}H-Naloxon an Glasfilter (111), von ^{125}J-Insulin an Talk (112) und von ^{3}H-Etorphin an Cerebroside (113).

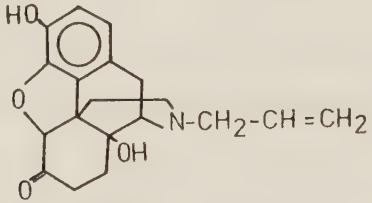
Rezeptorbindungsstudien an Gehirnopioidrezeptoren wurden durchgeführt (4-6). Es wurde auch über Bindungsstudien von ^{3}H-Dihydromorphin an Neuroblastoma x Glioma Hybridzellen 108CC15 in Suspension berichtet (83). Dieser Test sollte reproduziert und für unsere Zwecke anwendbar gemacht werden. Aus Gründen, die später dargelegt werden, wurden für die Messung von Opioiden in Zellextrakten jedoch Hybridzellmembranen für die Bindungsexperimente benutzt.

I. 2.2. Bindung von ^{3}H-Naloxon an Zellen in Suspension

In einer Vielzahl von Experimenten (84) ist es nicht gelungen, mit der in (83) angegebenen Methode die publizierten Ergebnisse vernünftig zu reproduzieren. W. Klee et al. (83) bedienten sich der Zentrifugationsmethode, um gebundene und ungebundene Liganden voneinander zu trennen. In den Niederschlag mitgerissene Ligandenlösung erhöht die gemessene Radioaktivität. Die spezifische Bindung ergibt sich dann als Differenz großer Zahlen und ist folglich mit großem Fehler behaftet.

Deshalb wurde für alle weiteren Experimente die Filtrationsmethode nach C. Pert et al. (114) benutzt.

Die Bindungsstudien wurden zunächst mit ^{3}H-Naloxon durchgeführt.



Naloxon

Abb. 15 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bindung von ^{3}H-Naloxon an Hybridzellen in Suspension.

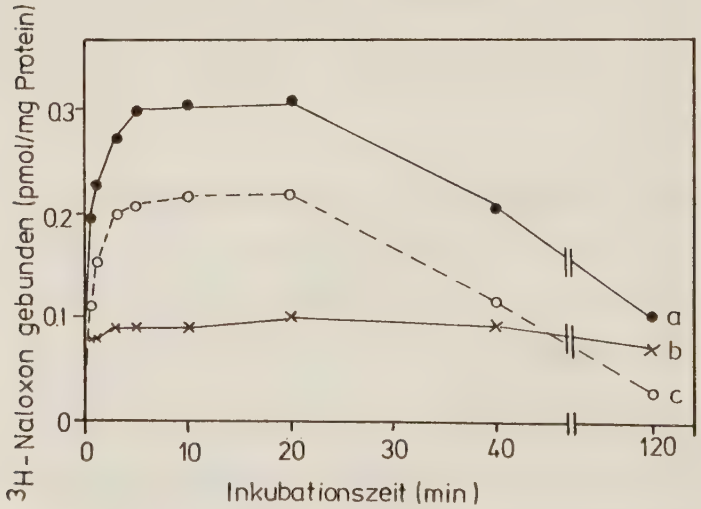


Abb. 15. Zeitlicher Verlauf der Bindung von ^{3}H-Naloxon an Hybridzellen in Suspension.

Kurve a: GB, Kurve b: UB, Kurve c: SB. Die Inkubationen werden bei 4° C in 0.01 M Tris•HCl, 0.32 M Saccharose, pH 8.0 (37° C) durchgeführt. 0.98 mg Hybridzellprotein (P 14) pro Ansatz. Die Konzentration an ^{3}H-Naloxon beträgt 5nM.

Die Werte sind Mittelwerte von Triplikaten (Streuung $\lesssim$ 10%).

Die Bindung von ^{3}H-Naloxon erfolgt selbst bei 4° C sehr rasch. Ein Plateau wird nach 5 min Inkubation erreicht. Der Abfall der spezifischen Bindung ab 20 min Inkubation wird immer beobachtet. Er ist bei 37° C wesentlich rascher (84), wobei nach 5 min Inkubation ein stabiles Niveau (bei etwa 0.1 pmol/mg Protein) erreicht wird. Worauf der beobachtete Verlust der spezifischen Bindung beruht, ist trotz einer Reihe von Experimenten nicht geklärt (84). Die Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration an ^{3}H-Naloxon ist in Abb. 16 zu sehen.

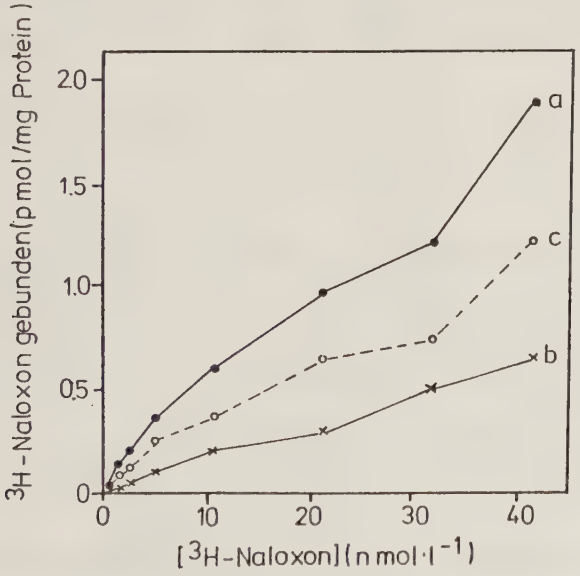


Abb. 16. Konzentrationsabhängigkeit der ^{3}H-Naloxon-Bindung an Hybridzellen in Suspension

Kurve a: GB, Kurve b: UB, Kurve c: SB

Inkubationen bei 4° C in 0.01 M Tris·HCl, 0.32 M Saccharose, pH 8.0 (37°C) für 10 min; 0.52 mg Hybridzellprotein (P 20) pro Ansatz. Die Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten (Streuung $\ll$ 10 %).

Wie in Abb. 16 wurde ebenfalls in anderen Experimenten, auch bei Variation der Inkubationsbedingungen (Temperatur, Zeit), kein richtiges Sättigungsplateau erreicht. Mit dem angedeuteten Plateau zwischen 20 und 30 nM ^{3}H-Naloxon läßt sich eine Dissoziationskonstante (K_D) von 10 nM und eine Rezeptorzahl von 3×10^5 pro Zelle berechnen (84), was den publizierten Angaben (83) entspricht. Wird das gleiche Experiment bei 37° C durchgeführt, werden bei gleichem K_D nur etwa 1×10^5 Rezeptoren pro Zelle gefunden, entsprechend dem beobachteten Verlust der spezifischen Bindung bei längerer Inkubation (s. Abb. 15).

Als ein Kriterium der spezifischen Bindung gilt Reversibilität. Deshalb wurde die Geschwindigkeit der Dissoziation von ^{3}H-Naloxon vom Rezeptor bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Nach 10-minütiger Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Naloxon wurde ein Überschuß "kalten" Naloxons zugegeben und zu verschiedenen Zeiten die gebundene Radioaktivität bestimmt. Durch die Isotopenverdünnung sollte die gebundene Radioaktivität im Laufe der Zeit abnehmen.
Abb. 17 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches.

Die Halbwertszeit bei 4° C (Abb. 17, A, Kurve a) beträgt ca. 1 min. Bei höheren Temperaturen ist sie $<$ 10 sec. Die unterschiedlichen Mengen gebundenen ^{3}H-Naloxons bei der Zeit t = 0 spiegeln erneut den anscheindenen Rezeptorenverlust bei höheren Temperaturen und längerer Inkubation (10 min) wieder. Wegen der außerordentlich schnellen Dis-

soziation von ^{3}H-Naloxon vom Rezeptor muß der Filtrationsvorgang am Ende der Inkubation so schnell als möglich ($\lesssim$ 10 sec) durchgeführt werden. Der Puffer zum Nachwaschen muß eiskalt sein, um dadurch die Dissoziation zu verlangsamen.

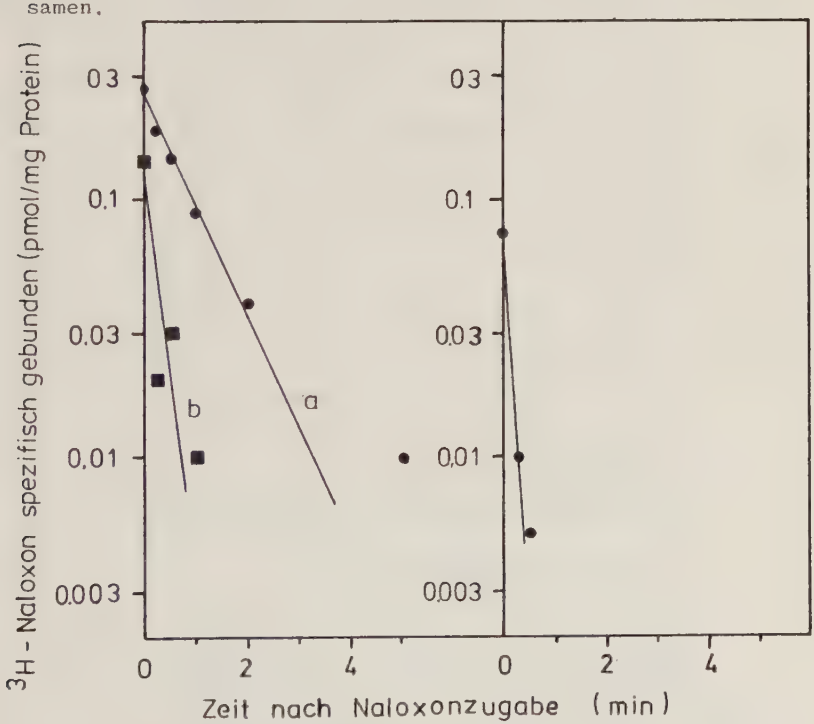


Abb. 17. Dissoziationskinetik von ^{3}H-Naloxon bei verschiedenen Temperaturen

A: Kurve a: 4° C; Kurve b: 20° C

B: 37° C

10 min Vorinkubation mit 5nM ^{3}H-Naloxon; 0.8 mg Hybridzellprotein (P 14) pro Ansatz. Puffer: 0.01 M Tris•HCL, 0.32 M Saccharose, pH 8.0.

Die Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten (Streuung $\lesssim$ 10 %).

I. 2.3. Kompetition von Opioiden und anderen Neurohormonen mit ^{3}H-Naloxon um die Bindungsstellen

Opioide sollten mit ^{3}H-Naloxon um die Bindung an Opioidrezeptoren von Hybridzellen in Suspension kompetieren. Bei steigenden Konzentrationen an Opioiden wird weniger radioaktives Naloxon spezifisch gebunden. In Abb. 18 sieht man, daß "kaltes" Naloxon, Levorphanol und Leu-Enkephalin die Bindung von ^{3}H-Naloxon verhindern können. Der cholinerge Agonist Carbachol (Carbamoylcholin) dagegen kann das nicht. Auffällig ist, daß der IC_{50}-Wert für Leu-Enkephalin von 1 µM etwa 3 Größenordnungen nach rechts verschoben ist gegenüber dem im cyclo AMP-Test gefundenen, Leu-Enkephalin ist in seiner Wirkung, die PGE_1-stimulierte cyclo AMP-Bildung zu unterdrücken, etwa zwei Größenordnungen potenter als Levorphanol (87). Da in der Zellsuspension unter den Bedingungen des Tests die Lebensfähigkeit der Zellen höchstens 70 % beträgt, liegt es nahe anzunehmen, daß Proteasen aus den toten, durchlässig gewordenen Zellen Leu-Enkephalin abbauen. Um diese Annahme zu prüfen, wurde 0.1 µM Leu-Enkephalin 10 min bei 37° C mit und ohne Zellen in Suspension inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand im cyclo AMP-Test auf Opioidaktivität untersucht. In der Lösung, die mit Zellen inkubiert wurde, war keine Opioidaktivität mehr feststellbar (Daten nicht gezeigt). Wenn man die Anwesenheit von Opioidpeptiden in Extrakten mittels des Rezeptorbindungstests nachweisen will, ist es deshalb unter unseren Be-

dingungen nicht möglich, Zellen in Suspension zu verwenden. Als Alternative bieten sich Plasmamembranpräparationen an.

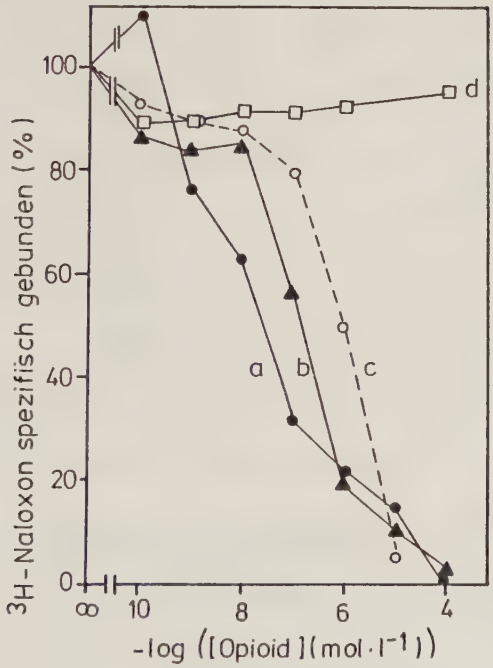


Abb. 18. Einfluß der Konzentration von Opioiden und Carbachol auf die spezifische Bindung von ^{3}H-Naloxon an Hybridzellen in Suspension .

Inkubation 10 min, bei 37° C in 0.01 M Tris·HCl, 0.32 M Saccharose, pH 8.0 (37° C). Konzentration an ^{3}H-Naloxon 5 nM.

Naloxon (Kurve a), Levorphanol (Kurve b), Leu-Enkephalin (Kurve c), Carbachol (Kurve d).

0.7 mg Hybridzellprotein (P 17) pro Ansatz.

Die Werte sind Mittelwerte aus Triplikaten (Streuung $\leqslant$ 10 %).

I. 2.4. Bindung von ^{3}H-Naloxon und ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen

Die Verwendung von ^{3}H-Met-Enkephalin für Bindungsstudien an Rattenhirnmembranen (115) und von ^{125}J-D-Ala^{2}-Leu-Enkephalin an Hybridzellhomogenat (116) ist beschrieben. Wir verwendeten anfänglich als radioaktiven Liganden ^{3}H-Naloxon, später ^{3}H-Leu-Enkephalin. Dieser Wechsel war nötig geworden, da bei einer Lieferung ^{3}H-Naloxon nur unzureichende spezifische Bindung gefunden wurde. Außerdem ist der prozentuale Anteil der spezifischen Bindung bei Verwendung von ^{3}H-Leu-Enkephalin höher (80 - 90 %) als bei Verwendung von ^{3}H-Naloxon (50 - 70 %). Die Ergebnisse, die mit beiden radioaktiven Liganden erhalten werden, sind qualitativ gleich. Abb. 19 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen. Man sieht, daß bereits nach 5 min Inkubation bei 25° C nahezu maximale Bindung erreicht ist. Gleiches gilt für die Bindung von ^{3}H-Naloxon sowohl bei 0° C als auch bei 25° C. Die maximale Bindung sowohl von ^{3}H-Naloxon als auch von ^{3}H-Leu-Enkephalin bleibt mindestens eine Stunde erhalten. Die Temperatur von 25° C wurde in der Hoffnung gewählt, die Aktivität etwaiger Proteasen in der Membranpräparation zu erniedrigen. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Zellen in Suspension (pH 8.0) wurden die Experimente mit Membranen bei pH 7.4 durchgeführt. Der Grund ist, die Bedingungen des Bindungstests und des cyclo AMP-Tests möglichst aneinander anzugleichen. Die Vergleichbarkeit der mit beiden Tests erhaltenen Ergebnisse ist dadurch eher gewährleistet.

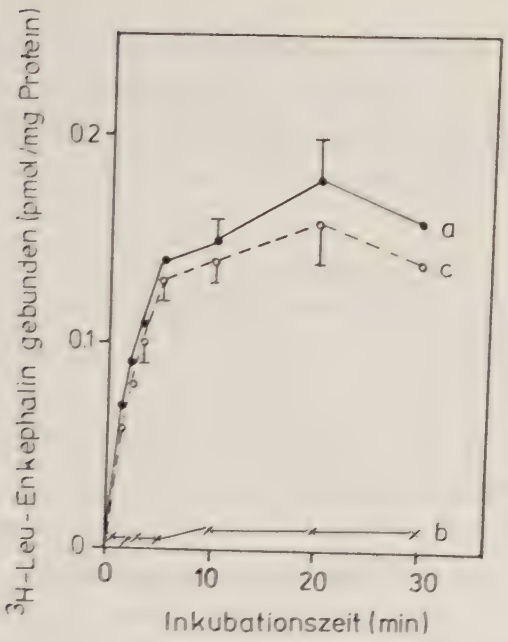


Abb. 19. Zeitabhängigkeit der Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen

Inkubationen bei 25° C in 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C), 0.39 mg Protein/Ansatz.

Kurve a: GB, Kurve b: UB, Kurve c: SB

Konzentration an ^{3}H-Leu-Enkephalin: 7 nM.

Die Inkubationsbedingungen gelten für alle weiteren Bindungsexperimente.

Die Dissoziationskonstante von ^{3}H-Leu-Enkephalin wurde aus der Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen ermittelt (Abb. 20).

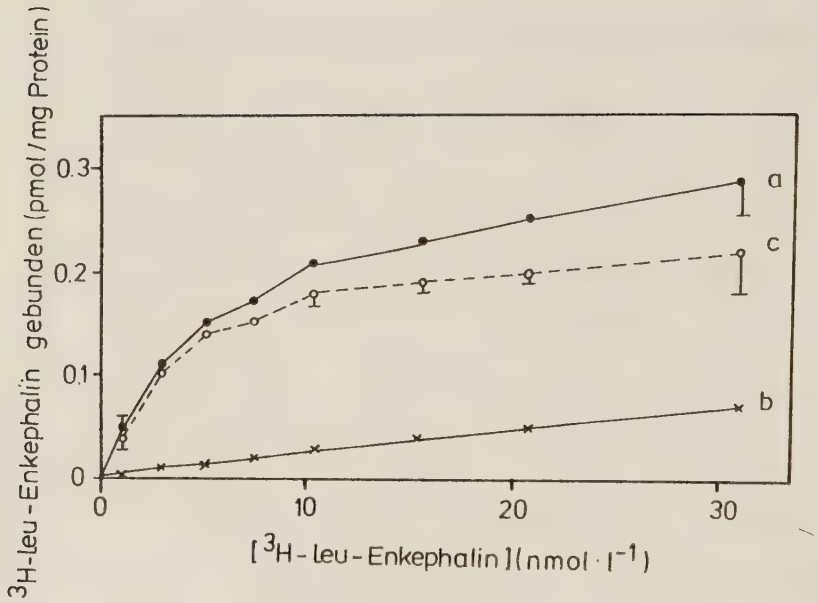


Abb. 20. Abhängigkeit der Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin von der Konzentration.
Inkubationen 10 min bei 25° C, pH 7.4, 0.32 mg Protein/Ansatz.
Kurve a: GB, Kurve b: UB, Kurve c: SB

Man sieht, daß die spezifische Bindung eine Sättigungsfunktion darstellt. Werden die Werte für die Konzentrationen und die jeweils gebundene Menge an ^{3}H-Leu-Enkephalin doppeltreziprok nach Lineweaver und Burk aufgetragen, läßt sich daraus eine Dissoziationskonstante K_D (= Konzentration bei halbmaximaler Sättigung) von 4 nM ablesen. Das entspricht dem IC_{50}-Wert von 3 nM, der für die Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs gefunden wird (87, 98). Ebenfalls ein

K_D-Wert von 3.5 nM für die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellen in Suspension wurde von einer anderen Gruppe berichtet (117). Der entsprechende K_D-Wert für ^{3}H-Naloxon ergibt sich unter gleichen Bedingungen zu 15 nM.

Hybridzellen in Suspension sind kein gutes System zur Durchführung von Bindungsstudien (schneller Verlust der spezifischen Bindung mit der Zeit, keine ordentliche Sättigung der Rezeptoren, Proteolyse). Membranen aus Hybridzellen dagegen stellen ein stabiles, sättigbares System dar. Leu-Enkephalin wird während der Inkubation nicht abgebaut. Weitere Versuche wurden deshalb mit Membranpräparationen durchgeführt. Da Membranen aus Rattengehirnen wesentlich schneller und in größerer Menge zu erhalten sind als aus Hybridzellen (keine zeitaufwendige Zellzüchtung!), wurden solche für Bindungsstudien verwendet. Die Sensitivität gegenüber Leu-Enkephalin (IC_{50} 1/uM) mit ^{3}H-Naloxon als radioaktivem Liganden ist jedoch wesentlich niedriger als in Hybridzellen. Sie wurden deshalb nicht weiter benutzt.

2.5. Kompetition von Opioiden mit ^{3}H-Naloxon und ^{3}H-Leu-Enkephalin um die Bindungsstellen

Wenn die Bindung von radioaktivem Leu-Enkephalin und ^{3}H-Naloxon an Rezeptoren in Hybridzellmembranen spezifisch ist, müssen Opioide mit diesen radioaktiven Opioiden um die Bindung konkurrieren. In Abb. 21 wird die Wirksamkeit von Leu-Enkephalin, Naloxon und ß-Endorphin verglichen.

Der IC_{50}-Wert für Leu-Enkephalin (Kurve a) beträgt 3 nM, der für Naloxon 10 nM (Kurve b) und der für ß-Endorphin (Kurve c) etwa 40 nM.

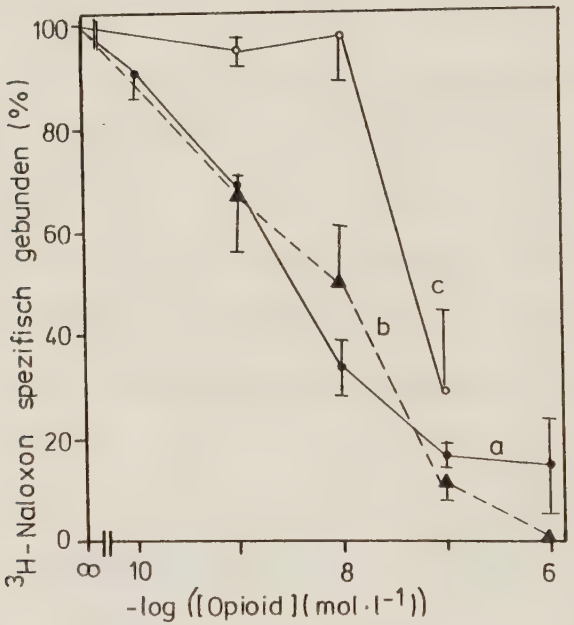


Abb. 21. Kompetition von Leu-Enkephalin, Naloxon und ß-Endorphin mit ^{3}H-Naloxon um die Bindung .
Inkubation 10 min bei 25° C, pH 7.4, 0.45 mg Protein/Ansatz.
Leu-Enkephalin (Kurve a), Naloxon (Kurve b), ß-Endorphin (Kurve c).
Konzentration an ^{3}H-Naloxon 16 nM.

Für die Hemmung des durch PGE_1 hervorgerufenen Anstiegs des cyclo AMP-Gehalts sind IC_{50}-Werte von 1-3 nM für Leu-Enkephalin bzw. 7 nM für ß-Endorphin von M. Brandt bestimmt worden (87, 118). Da der IC_{50}-Wert bei Kompetierungsexperimenten (Bindungstest) von der Konzentration des radio-

aktiven Liganden abhängt, können die IC_{50}-Werte aus beiden Arten von Experimenten nicht direkt verglichen werden. Der IC_{50}-Wert für Naloxon entspricht dem, der auch bei Verwendung von Zellsuspensionen gefunden wurde (s. Abb. 18).

Auch die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an die Opioidrezeptoren von Hybridzellmembranen wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von Opioiden gemindert. Abb. 22 zeigt die Hemmkurven einiger Opioidpeptide, die sich bereits im cyclo AMP-Test als aktiv erwiesen haben (siehe Abb. 12, Seite 36). Von den eingesetzten Peptiden hat Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 den kleinsten IC_{50}-Wert (3 nM, Abb. 22, Kurve a), gefolgt von Leu-Enkephalin (Kurve b) mit 10 nM. Wie bereits erwähnt (S.35), wird von einer anderen Gruppe berichtet (99), daß Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 im Bindungstest an Hybridzellen in Suspension nur etwa 40 % der Potenz von Leu-Enkephalin besitzt. Für die Diskrepanz dieser Ergebnisse gibt es derzeit keine Erklärung. Der IC_{50}-Wert für Leu-Enkephalin (10 nM) liegt höher als der für die Hemmung des hormonell erhöhten cyclo AMP-Spiegels (1-3 nM Ref. 87, 98 und eigene Daten). Der entsprechende Wert für α-Neo-Endorphin (10 nM; Abb. 22, Kurve c) und Dynorphin (12 nM, Kurve d) entsprechen den im cyclo AMP-Test erhaltenen (12 nM bzw. 13 nM, s. Abb. 12, Kurven d, e), während derjenige für Met-Enkephalin-Arg^6 (40 nM; Abb.22, Kurve e) erhöht ist gegenüber dem IC_{50}-Wert für die Hemmung des Anstiegs der cyclo AMP-Konzentration (12 nM; Abb. 12, Kurve c). Alle eingesetzten Opioide hemmen jedoch eindeutig

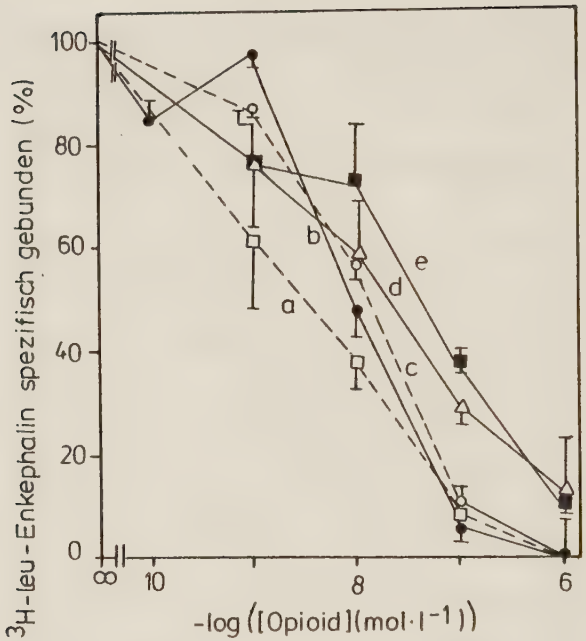


Abb. 22. Einfluß der Konzentration verschiedener Opioide auf die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen.

Inkubation 10 min bei 25° C, pH 7.4, 0.31 mg Protein/Ansatz.

Opioide: Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 (Kurve a), Leu-Enkephalin (Kurve b), α-Neo-Endorphin (Kurve c), Dynorphin (Kurve d), Met-Enkephalin-Arg^6 (Kurve e).

Konzentration an ^{3}H-Leu-Enkephalin 7 nM.

und spezifisch die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an die Opioidrezeptoren in Hybridzellmembranen.

Dermorphin und Hyp^6-Dermorphin (Opioidpeptide aus Froschhaut (106)) hemmen die durch PGE_1 hervorgerufene Erhöhung des intrazellulären cyclo AMP-Spiegels in den Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (s. Abb. 14, S. 40). Es wurde untersucht,

ob diese Peptide auch mit ^{3}H-Leu-Enkephalin um die Bindungsstellen konkurrieren können. Man sieht in Abb. 23, daß vom Dermorphin (Kurve a) über Hyp^{6}-Dermorphin (Kurve b) zum L-Ala^{2}-Dermorphin (Kurve d) die Fähigkeit, die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin zu verhindern, in gleicher Weise abnimmt wie im cyclo AMP-Test (s. Abb. 14, S. 40). Die IC_{50}-Werte in beiden Testsystemen entsprechen einander (wegen der Bedeutung dieser Übereinstimmung siehe Kommentar S.55). Zum Vergleich ist die Hemmkurve von nichtmarkiertem Leu-Enkephalin (Kurve c) eingezeichnet (man beachte die veränderte Abszisseneinteilung für Leu-Enkephalin!). Dieses Ergebnis zeigt zusätzlich zu den Befunden über die Regulation des cyclo AMP-Spiegels, daß Dermorphin und seine Analoga an Opioidrezeptoren von Maus-Neuroblastoma x Ratten-Glioma-Hybridzellen wirken können.

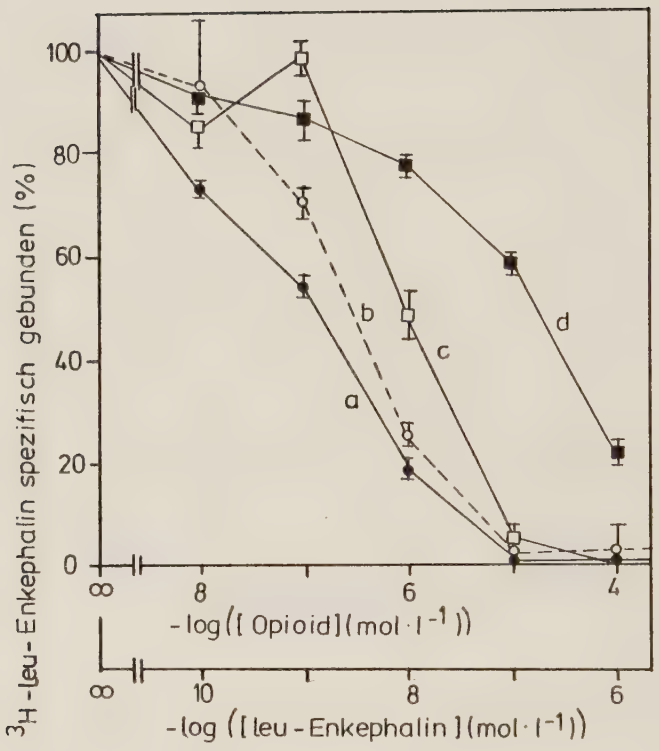


Abb. 23. Einfluß der Konzentration von Dermorphin und seinen Analoga sowie Leu-Enkephalin auf die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin.

Inkubation 10 min bei 25°C, pH 7.4, 0.3 mg Protein/Ansatz.

Opioide: Dermorphin (Kurve a), Hyp^6-Dermorphin (Kurve b), Leu-Enkephalin (Kurve c) und L-Ala^2-Dermorphin (Kurve d).

Konzentration an ^{3}H-Leu-Enkephalin: 7 nM

I. 2.6. Somatostatin bindet nicht an Opioidrezeptoren von Hybridzellen.

Somatostatin (SRIF, somatotropin release inhibitory factor), ein Tetradecapeptid, wurde zuerst im Hypothalamus entdeckt (119). Später wurde es auch in anderen Bereichen des Gehirnes (120), im Pankreas (121), Magen (121, 122) und im Darm (123) gefunden. Somatostatin hemmt die Freisetzung einiger Hormone wie Wachstumshormon (Somatotropin) (119), Glucagon, Insulin und Gastrin (124, 125). Somatostatin hemmt auch die durch Opioide wie Morphin hervorgerufene Freisetzung von Wachstumshormon (126, 127). Deshalb wurde vermutet, und auch experimentell unterstützt, daß Somatostatin als Antagonist an Opioidrezeptoren wirkt (128). Im Gegensatz dazu gibt es auch Befunde, daß SRIF bei intraventrikulärer Injektion ähnlich wie Morphin analgetisch wirkt (129). Auf Grund dieser Befunde wurde in Zusammenarbeit mit J. Traber und M. Brandt untersucht, ob SRIF an Opioidrezeptoren von Hybridzellen binden und über diese biologisch wirken kann. Man sieht in Abb. 24 (Kurven b), daß SRIF weder die Bindung von ^{3}H-Naloxon an Zellen in Suspension (A) noch die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Zellmembranen (B) beeinflußt. Etorphin (A, Kurve a) bzw. Leu-Enkephalin (B, Kurve a) hemmen (zum Vergleich) die Bindung der radioaktiven Liganden. J. Traber und M. Brandt zeigten, daß SRIF die durch PGE_1 stimulierte Aktivität der Adenylatcyclase in Hybridzellen hemmt (88). Naloxon (10 μM) beeinträchtigt die Aktivität von SRIF nicht. SRIF wirkt also nicht über Opioidrezeptoren.

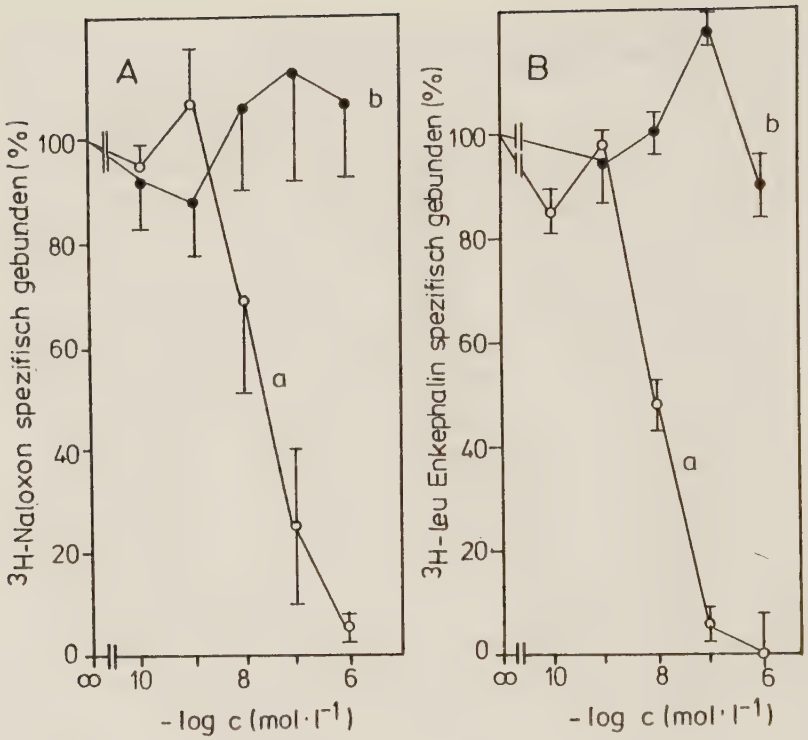


Abb. 24. Einfluß von Somatostatin auf die Bindung von radioaktiven Liganden an Opioidrezeptoren.

A. Bindung von ^{3}H-Naloxon (5 nM) an Zellen in Suspension. Inkubation 10 min bei 37° C, in 0.01 M Tris•HCl, 0.32 M Saccharose, pH 8.0 (37° C), 0,4 mg Protein pro Ansatz.

Kurve a: Etorphin, Kurve b: Somatostatin

B. Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin (7 nM) an Hybridzellmembranen. Inkubation 10 min bei 25° C, in 0.05 M Tris•HCl, pH 7.4 (25° C); 0.36 mg Protein pro Ansatz.

Kurve a: Leu-Enkephalin, Kurve b: Somatostatin

SRIF zeigt auch keine opioidantagonistische Wirkung im Hybridzellsystem (88). Am Ende der Inkubation mit Hybridzellen in Suspension war SRIF noch aktiv. Die Erhöhung der cyclo AMP-Konzentration durch PGE_1 wurde noch gehemmt (Daten nicht gezeigt).

Die mit Hybridzellen erhaltenen Ergebnisse stehen scheinbar im Widerspruch zu Berichten aus der Literatur (128, 129). Opioideffekte von Somatostatin können bei in vitro Experimenten auf Verunreinigungen des SRIF-Präparates mit Opioidpeptiden beruhen. Bei in vivo-Versuchen könnten analgetische Effekte durch die Freisetzung von Opioidpeptiden ausgelöst werden. In den D-Zellen des Pankreas wird immunhistochemisch SRIF und ß-Endorphin gemeinsam vorkommend gefunden (70). ß-Endorphin reguliert die Sekretion von Somatostatin, Glucagon und Insulin (130). Möglicherweise reguliert Somatostatin auch die ß-Endorphin-Freisetzung aus bestimmten Zellen. Nach obigen Ergebnissen besitzen die Hybridzellen Somatostatinrezeptoren. Im Gegensatz zu in der Literatur geäußerten Vermutungen sind diese nicht mit den Opioidrezeptoren identisch. Die Hybridzellen 108CC15 können deshalb zur Charakterisierung dieser SRIF-Rezeptoren sowie zur Untersuchung der Wirkungsweise von SRIF benutzt werden.

I. 3. Beschreibung eines Radioimmunotests zur quantitativen Bestimmung von Enkephalinen

Die hohe Spezifität, mit der Antikörper ihre Antigene erkennen, kann zur quantitativen Erfassung der Antigene ausgenützt werden. D. van Calker konnte aus Kaninchen ein Antiserum gewinnen, das gegen Leu-Enkephalin gerichtet ist (85). Leu-Enkephalin war vor der Immunisierung des Kaninchens mit Glutaraldehyd an Rinderserumalbumin als Trägermolekül gekoppelt worden. Der hier benützte radioimmunologische Test (RIA) wurde von D. van Calker erarbeitet (85). Unbekannte Mengen Enkephalin und bekannte Mengen radioaktiven Leu-Enkephalins konkurrieren um die Bindungsstellen an den spezifischen Antikörpern im Antiserum. Mit bekannten Mengen nichtradioaktiven Enkephalins läßt sich eine Eichgerade (Abb. 25) zur Bestimmung des Enkephalingehalts unbekannter Proben erstellen. Der Bereich der Eichgeraden erstreckt sich von 0.1 - 10 pmol. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0.1 - 0.15 pmol Leu-Enkephalin. Mit I_o ist diejenige Radioaktivitätsmenge bezeichnet, die an das Bindungsprotein gebunden wird, wenn nur ^{3}H-Leu-Enkephalin eingesetzt wird ("Null-Standard"). I_x bezeichnet die Radioaktivitätsmenge, die gebunden wird, wenn zusätzlich die in der Abszisse angegebene Menge an unmarkiertem Leu-Enkephalin im Testansatz anwesend ist. Eine Antiserumverdünnung von 1:200 hat sich bezüglich der Menge gebundenen radioaktiven Leu-Enkephalins und der Steigung der Eichgeraden als optimal erwiesen (Ref. 85 und eigene Messungen).

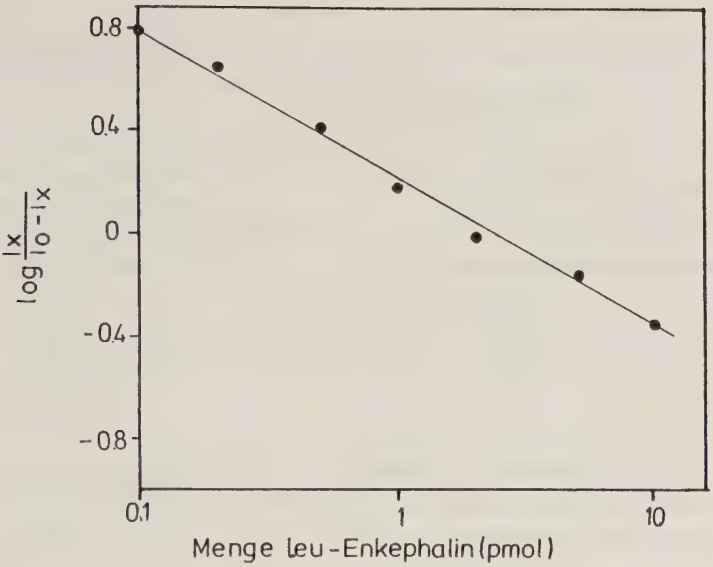


Abb. 25. Eichgerade zur radioimmunologischen Bestimmung von Leu-Enkephalin. Antiserumverdünnung 1:200. Die Bezeichnungen I_o und I_x sind im Text definiert.

Zur sicheren Bestimmung des Enkephalingehalts in unbekannten Proben ist es notwendig, die Spezifität des Antiserums zu kennen. Das verwendete Antiserum besitzt eine ausgeprägte Spezifität für Leu-Enkephalin (Tab. 7).

Tab. 7. Bestimmung der Spezifität des Antiserums gegen Leu-Enkephalin

Peptid (pmol eingesetzt)	Leu-Enkephalin-Äquivalente (pmol)
Met-Enkephalin (0.2)[a]	0.02 ± 0.02
(0.5)	0.14 ± 0.05
(2)	0.72 ± 0.17
(5)	2.44 ± 0.61
(10)	3.40 ± 0.69
H-Arg-Leu-Enkephalin (100)[b]	34.0 ± 8.5
Nle^5-Leu-Enkephalin (100)[b]	11.0 ± 2
H-Phe-Gly-Gly-Phe-Leu-OH (100)[b]	22.0 ± 7
Ala^2-Leu-Enkephalin (100)[b]	6.3 ± 0.3

Folgende Peptide (100 pmol) erbrachten Werte < 1 pmol [b]: α-, -ß-, γ-Endorphin, ß-LPH 61-75, ß-LPH 61-69, H-Tyr-Gly-Gly-OH, H-Tyr-Gly-Gly-Phe-OH, H-Phe-Gly-Gly-Phe-Met-OH, Angiotensin I und II, SRIF, Insulin, $ACTH_{1-39}$, $ACTH_{11-24}$, $ACTH_{1-28}$, Bradykinin, Oxytocin, Substanz P, Delta-sleep-inducing-Peptide (DSIP). Folgende Peptide (50 pmol) ergaben Werte < 0.2 pmol [a]: Met-Enkephalin-Arg^6, Leu-Enkephalin-Arg^6, Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7, Dynorphin 1-13, Dermorphin, Hyp^6-Dermorphin, L-Ala^2-Dermorphin. Morphin wird nicht erkannt [b].

[a] Eigene Messungen

[b] D. van Calker (Ref. 85 und persönliche Mitteilung).

Antikörperverdünnung bei allen Bestimmungen 1:200.

ACTH = Adrenocorticotropes Hormon; ß-LPH = ß-Lipotropes Hormon.

Diese Messungen wurden zum größten Teil von D. van Calker ausgeführt (Ref. 85 und persönliche Mitteilung). Die Kreuzreaktivität von Met-Enkephalin beträgt ca. 30 %. Da außer Met-Enkephalin kein anderes Opioidpeptid von diesem Antiserum erkannt wird, kann es zur Bestimmung von Leu- und Met-Enkephalin in Zellextrakten verwendet werden. Seit der Entdeckung der Enkephaline wurden in vielen Labors Antiseren gegen Met- oder Leu-Enkephalin gewonnen (z. B. 131-133).

I. 4. Zusammenfassung

1.) Saure Extrakte aus Hybridzellen hemmen den hormonell bedingten Anstieg des cyclo AMP-Gehalts in Hybrid- und Gliomazellen. Die Hemmung kann nicht durch Atropin (cholinerger Antagonist) bzw. Naloxon (Opioidantagonist) unterdrückt werden. Behandlung der Extrakte mit verschiedenen Proteasen führt zu keiner Inaktivierung. Erste Versuche zur gelchromatographischen Auftrennung der Extrakte zeigen, daß in ihnen mehrere Substanzen enthalten sind, die den cyclo AMP-Gehalt in Hybridzellen regulieren können. Als Voraussetzung für die weitere Reinigung wurde ein sensitiveres Meßsystem entwickelt.

2.) Cyclo AMP-Messungen an Hybridzellen in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen liefern trotz veränderter Versuchsbedingungen gleiche Ergebnisse wie an Zellen in herkömmlichen Petrischalen. Die Sensitivität kann durch Verkleinerung des Inkubationsvolumens stark gesteigert, der Materialverbrauch erniedrigt werden.

3.) Verschiedene Opioide wie (mit abnehmender Aktivität) Leu-Enkephalin=Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 > Met-Enkephalin-Arg^6 = α-Neo-Endorphin > Dynorphin hemmen den durch PGE_1 hervorgerufenen Anstieg des cyclo AMP-Gehalts (IC_{50}-Werte 1-13 nM). Die jeweilige Hemmung wird durch Naloxon unterdrückt. Die Exorphine ß-Casomorphin-(1-5) und ß-Casomorphin-(1-4) (aus Casein) sind bis zu einer Konzentration von 1 µM nicht aktiv. Hingegen zeigen Dermorphin und Hyp^6-Dermorphin, D-Alanin enthaltende Opioidpeptide aus Froschhaut, Opioidaktivität in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (IC_{50}-Wert 0.1-0.3 µM). Das L-Ala^2-Analogon besitzt weniger als 0.1 % der Aktivität von Dermorphin.

4.) An Hybridzellen können Opioidrezeptorbindungsstudien durchgeführt werden. Die spezifische Bindung von ^{3}H-Naloxon an Zellen in Suspension verringert sich im Laufe der Zeit von ca. 70 % auf weniger als 50 % (der Gesamtbindung), wobei zusätzlich die Gesamtbindung um ca. 60 % abnimmt. Der Verlust erfolgt bei 37° C innerhalb von 10 min, bei 4° C in 120 min. Die Bindungsstellen sind nicht eindeutig sättigbar. Die Dissoziationskonstante für ^{3}H-Naloxon beträgt 10 nM, die Zahl der Rezeptoren pro Zelle 1-3 x 10^5, je nach Bedingungen. Die Halbwertszeit der Dissoziation von ^{3}H-Naloxon vom Rezeptor beträgt ca. 1 min bei 4° C und < 10 sec bei 20° C und 37° C. Opioide, aber nicht Carbachol, konkurrieren mit ^{3}H-Naloxon um die Bindungsstellen. Leu-Enkephalin wird während der Inkubation größtenteils abgebaut.

5.) Die spezifische Bindung von ^{3}H-Naloxon (50-70%) und ^{3}H-Leu-Enkephalin (80-90%) an Plasmamembranen von Hybridzellen ist nach 5 min maximal und ist lange (mindestens 1 h) stabil. Sie ist sättigbar. Die Dissoziationskonstante beträgt für ^{3}H-Naloxon 15 nM, für ^{3}H-Leu-Enkephalin 4nM. Leu-Enkephalin (IC_{50} 3nM), Naloxon (IC_{50} 10 nM) und ß-Endorphin (IC_{50} 40 nM) konkurrieren mit ^{3}H-Naloxon um die Bindung an die Rezeptoren.

6.) Die spezifische Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an die Opioidrezeptoren der Hybridzellen wird gehemmt durch Met-Enkephalin-Arg^{6}-Phe^{7} (IC_{50} 3nM), Leu-Enkephalin (IC_{50} 10 nM), α -Neo-Endorphin (IC_{50} 10 nM), Dynorphin (IC_{50} 12 nM), Met-Enkephalin-Arg^{6} (IC_{50} 40 nM), Dermorphin (IC_{50} 0.2 uM), Hyp^{6}-Dermorphin (IC_{50} 0.4 uM) und L-Ala^{2}-Dermorphin ($IC_{50} > 10$ uM).

7.) In Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen kompetiert Somatostatin nicht mit ^{3}H-Naloxon oder ^{3}H-Leu-Enkephalin um die Bindung an Opioidrezeptoren.

8.) Die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an einen für Leu- und Met-Enkephalin hochspezifischen Antikörper kann für einen radioimmunologischen Test verwendet werden. Eine mit nichtradioaktiv markiertem Leu-Enkephalin erstellte Eichgerade erstreckt sich von 0.1 - 10 pmol (Nachweisgrenze 0.1 pmol). Der Antikörper kreuzreagiert nicht mit Opioiden, Enkephalinderivaten und anderen biologisch wirksamen Peptiden.

II. Reinigung und Charakterisierung von Opioidpeptiden aus Hybridzellen

In den vorangegangenen Kapiteln sind drei voneinander unabhängige Testsysteme beschrieben worden, mit denen kleine Mengen Opioide spezifisch nachgewiesen werden können. Wenn in Extrakten von Hybridzellen Opioidpeptide enthalten sind, müssen die mittels des Bindungstests und des cyclo AMP-Tests erhaltenen Ergebnisse übereinstimmen (verschiedene Opioidpeptide haben den gleichen Effekt). Das gilt nicht für den radioimmunologischen Test, da der Antikörper nur Met- und Leu-Enkephalin erkennt. Nur wenn speziell Met- oder Leu-Enkephalin allein oder zugleich in Extrakten zugegen sind, sollten die Ergebnisse aller drei Tests miteinander korrelieren. Wenn man sich nur auf ein Testsystem verläßt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, eventuell Artefakte zu messen und gegebenenfalls etwas anzureichern, wonach man nicht gesucht hat. Solche Fälle sind aus der Literatur bekannt (z. B. 134). Um die Zuverlässigkeit der Messungen und ihre Aussagekraft zu erhöhen, wurden nahezu alle Messungen an Extrakten, ungereinigt oder gereinigt, mit mindestens zwei der oben genannten Methoden durchgeführt. Zunächst wurden Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen untersucht. Später werden Extrakte verschiedener Herkunft nach gelchromatographischer Auftrennung miteinander verglichen.

II. 1. Untersuchungen an Rohextrakten

II. 1.1. Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen hemmen die Bildung von cyclo AMP

Wie schon in Kapitel I. 1.1. gezeigt, hemmen saure Extrakte aus Hybridzellen den durch PGE_1 hervorgerufenen Anstieg der intrazellulären cyclo AMP-Konzentration. Um etwas über die chemische Stabilität der aktiven Komponenten in den Extrakten zu erfahren, wurden verschiedene Extraktionsmethoden geprüft. Abb. 26 zeigt, daß

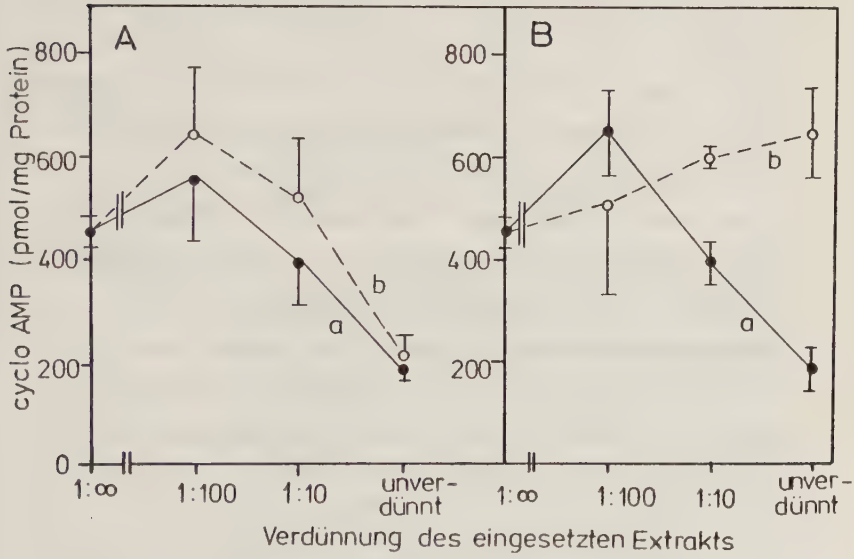


Abb. 26. Einfluß der Extraktionsmethode auf die Wirksamkeit von Hybridzellextrakten

4.6×10^5 lebende Zellen pro 60 mm Platte (87% Lebensfähigkeit, P 16). Zellen wurden extrahiert durch:

A: 1 M Essigsäure (Kurve a), 8 % Trichloressigsäure (TCA, Kurve b)

B: Ethanol (Kurve a), Homogenisieren und kochendes Wasser (10 min) (Kurve b).

Extrakte aus je 1.65×10^8 Zellen (P 16, je 19 Petrischalen). Unverdünnt eingesetzt: 30 µl $\hat{=}$ 5×10^6 extrahierten Zellen.

bei Extraktion der Zellen mit 1 M AcOH, 8 % TCA oder absolutem Ethanol gleich wirksame Extrakte erhalten werden. Werden die Zellen dagegen von Platten abgekratzt, homogenisiert, in kochendes Wasser gegeben und ein 100 000 g-Überstand getestet, wird keine Hemmaktivität mehr beobachtet. Es wurde nicht weiter untersucht, wodurch der Aktivitätsverlust erzeugt wird. Aus experimentellen Gründen (kein Ausschütteln mit Ether wie bei TCA-Extrakten, leichte Lyophilisierbarkeit) wurden nahezu alle weiteren Extrakte mit 1 M Essigsäure hergestellt.

Abb. 27 zeigt einen Vergleich der Wirksamkeiten je eines Extraktes aus Hybrid- und Gliomazellen in Abwesenheit und Gegenwart von Naloxon, einem Opioidantagonisten. Beide Extrakte hemmen stark die hormonell bedingte Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels. Naloxon unterdrückt die Wirksamkeit des Extraktes nicht, wie bereits früher festgestellt wurde. Es gibt daher aus diesem Versuch keinen Hinweis auf Opioidaktivität in den Extrakten. Andere, effizient die cyclo AMP-Bildung hemmende Komponenten sind aber enthalten.

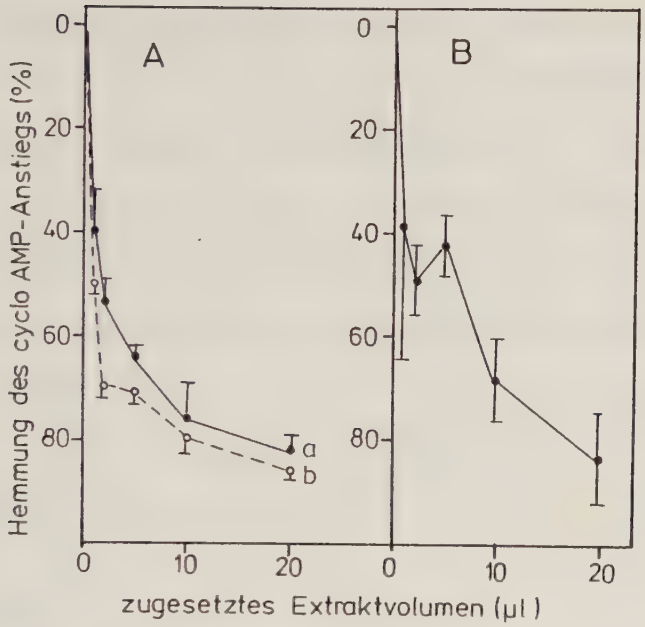


Abb. 27. Einfluß der Konzentration von Extrakten aus Hybrid- und Gliomazellen auf die Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels.

A: 2 x 10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 96 %, P 17), maximaler cyclo AMP-Wert 2380 ± 320 pmol/mg Protein.

B: 1.1 x 10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 95 %, P 24) maximaler cyclo AMP-Wert 822 ± 53 pmol/mg Protein.

Extrakte aus: A: ca. 3 x 10^8 Hybridzellen (P 17, 30 Petrischalen), getestet ohne (Kurve a) und mit (Kurve b) 10 µM Naloxon; 10 µl ≙ Extrakt aus ca. 3.7 x 10^6 Zellen.

B: aus ca. 8.1 x 10^8 C6-BU-1-Zellen (P 37, 29 Petrischalen). 10 µl ≙ Extrakt aus 8 x 10^6 Zellen.

II. 1.2. Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen hemmen die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Opioidrezeptoren und an spezifische Antikörper.

Die Extrakte wurden daher im Bindungstest und im RIA untersucht. In Abb. 28 A sieht man, daß sowohl der Extrakt aus Hybridzellen als auch aus Gliomazellen bei hohen Konzentrationen die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen beeinflussen können. Eine derartige Hemmung wird aber nicht bei jedem Extrakt gefunden. Unterschiedliche Opioidkonzentrationen in den Extrakten - wie sie tatsächlich vorkommen (s. Kap. III. 1.1., S.147) - können Ursache dafür sein. Gleiches gilt für die Extrakte aus Gliomazellen (s. Kap. II.4, S. 135).

Extrakte aus beiden Zell-Linien verhindern auch die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an spezifische Antikörper (Abb. 28 B). Es wurde nicht weiter untersucht, ob der Effekt wirklich spezifisch ist. Da bislang noch von keinen Gliazellen, die Opioide enthalten, in der Literatur berichtet wurde, scheint es eher unwahrscheinlich, daß die im RIA gemessenen Leu-Enkephalin-Äquivalente tatsächlich vorhandenen Enkephalinen entsprechen. Dem entgegengesetzt, ist aber gelegentlich in Gliomazellextrakten wirklich Opioidaktivität vorhanden (Kap. II. 4., S. 135). Vorversuche zur Charakterisierung der im RIA aktiven Substanz(en) (z. B. Verdauung mit Proteasen) von D. van Calker (85, 135 und unveröffentlichte Er-

gemisse) ergaben kein eindeutiges Bild. Es wurde berichtet (79), daß in Kochextrakten aus Hybridzellen 108CC15 und Gliomazellen C6-BU-1 keine Opioidaktivität (weniger als 0.1 pmol Met-Enkephalin pro mg Zellprotein) nachzuweisen ist. Wenn aber 0.1 pmol Leu-Enkephalin/mg Protein in den Zellen enthalten ist, könnten die im RIA gefundenen Werte damit erklärt werden. Anstatt jedoch weiter mit Kochextrakten zu arbeiten, wurde deshalb versucht, eventuell vorhandene Opioide aus diesen Extrakten anzureichern, um zu eindeutigen Ergebnissen zu kommen.

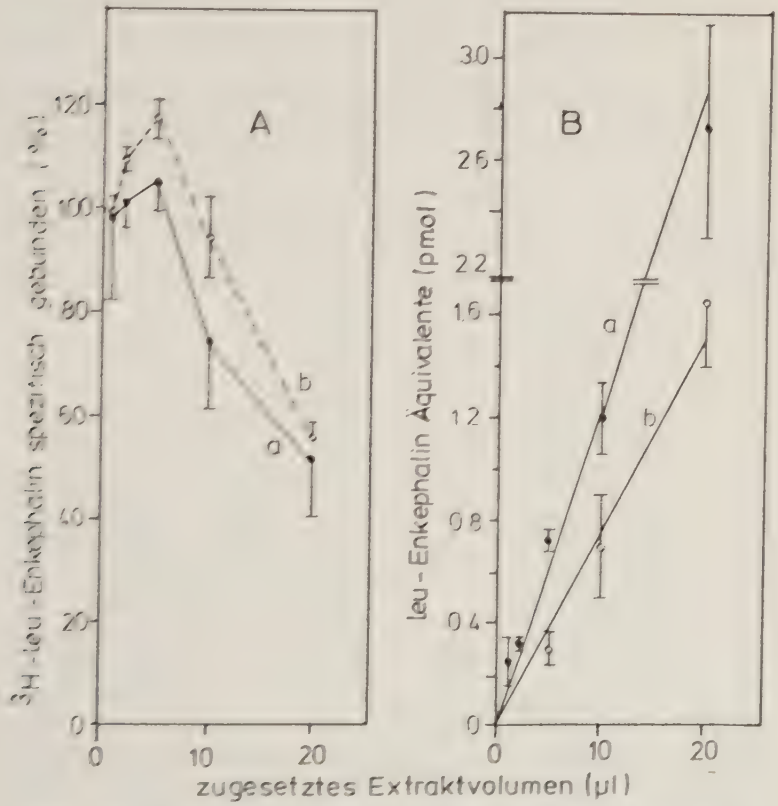


Abb. 28. Einfluß der Konzentration von Extrakten aus Hybrid- und Gliomazellen auf die spezifische Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen (A) und an einen spezifischen Antikörper (B). Die Extrakte sind dieselben wie in der Legende zu Abb. 27 beschrieben.

A: ^{3}H-Leu-Enkephalin-Konzentration 7 nM. Die spezifische Bindung beträgt 87 % der Gesamtbindung.

B: Antiserum 1:200 verdünnt.

Extrakte aus: Hybridzellen (Kurven a); Gliomazellen (Kurven b)

II. 1.3. Reinigung von Hybridzellextrakten mittels Gelchromatographie und Vorversuche zur Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen

Chromatographie von Extrakten an einer Biogel P 4-Säule (Ausschlußmolekulargewicht 4000 dalton) führt zu einer gewissen Auftrennung (s. Kap. I. 1.1.). Die Trennleistung konnte durch Verwendung einer größeren Säule gesteigert

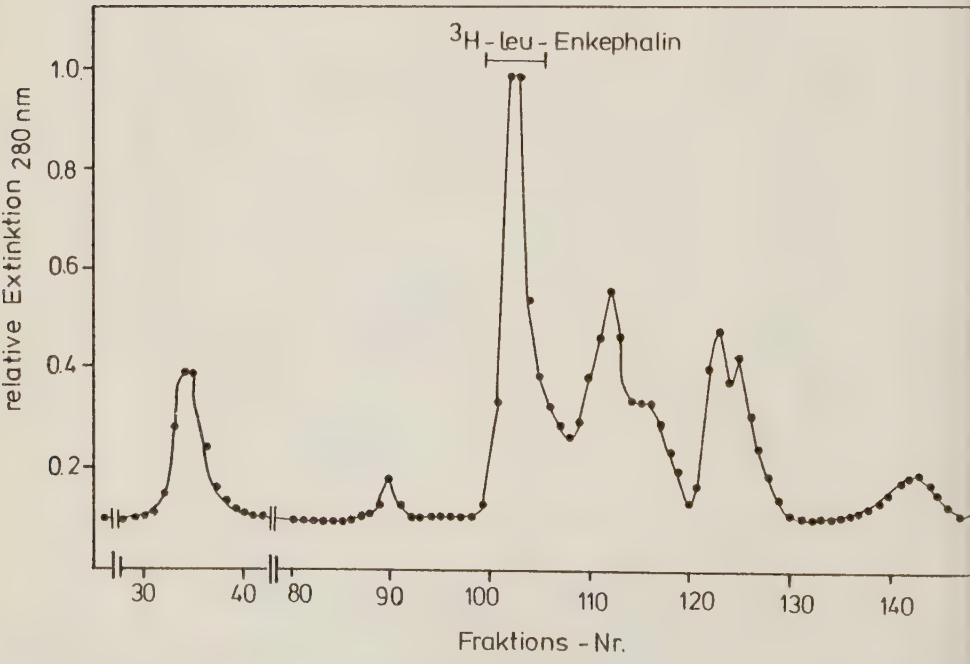


Abb. 29. Verfolgung der Trennung eines Extraktes auf einer Biogel P 4-Säule mittels Extinktionsmessung bei 280 nm.

Säule: 100 x 4 cm, Elutionsgeschwindigkeit 70 ml/h.
Fraktionsvolumen 10 ml. Auftrag: Extrakt aus ca. 5.0×10^8 Hybridzellen (P 20, 64 Petrischalen); Elutionsmittel: 0.1 M AcOH.

werden. Ein typisches UV-Extinktionsdiagramm zeigt Abb. 29. Die Fraktionen wurden entsprechend dem UV-Extinktionsdiagramm vereint, lyophilisiert, in Puffer gelöst und auf ihre Fähigkeit getestet, den cyclo AMP-Spiegel abzusenken. Das Ergebnis ist in Tab. 8 zu sehen.

Tab. 8. Wirkung von vereinigten Biogel P 4-Säulenfraktionen auf die cyclo AMP-Konzentration in Hybridzellen.

Fraktionen (10 /ul)	PGE_1 (0.3 /uM)	cyclo AMP (pmol/mg Protein)
-	-	20 ± 5
-	+	1980 ± 150
1 - 28	+	1850 ± 190
29 - 45	+	920 ± 60
46 - 88	+	156 ± 31
89 - 99	+	885 ± 156
100 - 111	+	110 ± 11
112 - 117	+	2030 ± 190
118 - 122	+	1970 ± 470
123 - 134	+	1490 ± 110
135 - 140	+	2080 ± 410
141 - 148	+	2075 ± 310
150 - 160	+	2270 ± 36
161 - 181	+	1970 ± 210

1.5×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 95 %, P 21). Extrakt aus ca. 3×10^8 Zellen (P 20, 35 Petrischalen); lyophilisierte Fraktionen in 1 ml H_2O aufgenommen.

Fünf Fraktionen zeigen zum Teil sehr starke Hemmwirkung (29-45, 46-88, 89-99, 100-111, 123-134). ^{3}H-Leu-Enkephalin eluiert von der Säule mit dem Hauptgipfel zwischen Fraktion 100 und 110. In Gegenwart von 10 uM Naloxon werden diesselben Hemmaktivitäten gefunden wie in Abwesenheit. Die starke Hemmung der Fraktion 100-110 wird also nicht durch Enkephalin hervorgerufen. Wird Wachstumsmedium ohne Serumzusatz, das 12 Stunden mit Hybridzellen in Kontakt war, in gleicher Weise aufgearbeitet, findet man in denselben Fraktionen Aktivität. Die Komponenten, die die Erniedrigung des cyclo AMP-Spiegels bewirken, werden folglich von den Zellen auch ins Medium abgegeben. Wachstumsmedium, das nicht mit Zellen in Kontakt war, besitzt keinerlei Hemmaktivität.

Die beiden am stärksten hemmenden Fraktionen, 46-88 und 100-111 (bei anderen Extrakten 98-108) wurden weiter untersucht. Es wurde versucht, durch Behandlung der Fraktionen mit gruppenspezifischen Reagentien, Proteasen sowie Säure und Lauge etwas über die chemische Natur der aktiven Komponenten zu erfahren. In der folgenden Liste sind die Reagentien sowie die chemischen Gruppen aufgeführt, die damit reagieren. Wenn eine von diesen Gruppen für die Aktivität wichtig ist, müßte nach Behandlung die Aktivität sinken oder ganz verschwinden.

Tab. 9. Gruppenspezifische Reagentien und ihre Angriffspunkte

Reagenz	angegriffene Bindung oder Gruppe
Pronase, Pepsin, Dispase, Trypsin, LAP, CPA, Papain	Peptidbindung
Proteinase K,	Peptidbindung
Acetylcholinesterase (AcChE)	Esterbindung
Ninhydrin, Fluorescamin	H_2N-
Jodessigsäure	HS-
Perameisensäure (PAS)	Methionin, Tyrosin
Jodchlorid (JCl)	Aromaten
Diazomethan (CH_2N_2)	HOOC-, Phenole,
Dithiothreitol	-S-S-
Bromcyan (BrCN)	Methioninreste
NaOH, HCl	Peptid- und Esterbindungen

Ohne Effekt auf eine der beiden Fraktionen sind: CPA, LAP, Pronase, Dispase, Trypsin, Papain, Proteinase K, Perameisensäure, Jodessigsäure, Dithiothreitol und BrCN. Acetylcholinesterase, JCl und Pepsin vermindern nicht die Wirksamkeit der Fraktionen 98 - 108. Als positive Kontrolle diente bei der Proteasen- und BrCN-Behandlung Leu- bzw. Met-Enkephalin bzw. AcCh für die AcCh-Esterase. Perameisensäureoxidation hat auf die Wirksamkeit von Met-Enkephalin keinen Einfluß (siehe Kapitel II. 3.3., Seite 116). Deshalb kann die Met-

Enkephalinaktivität nicht als Kontrolle für erfolgreiche Oxidation benutzt werden. Oxidiertes Met-Enkephalin (Met(O)-Enkephalin), läßt sich aber durch Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Met-Enkephalin abtrennen (siehe Kapitel II.3.3. S.116). In Kapitel C, VII. 4. (S. 239) wird gezeigt werden, daß Perameisensäure Met-Enkephalin vollständig oxidiert. Es scheint nach den bisher erhaltenen Daten sicher zu sein, daß die aktiven Substanzen in den Fraktionen 100 - 111 (bzw. 98 - 108) keine Peptide sind. In Tab. 10 ist der Einfluß verschiedener Agentien auf die Fähigkeit der Fraktionen gezeigt, den cyclo AMP-Spiegel zu regulieren. Die Daten stammen aus verschiedenen Experimenten. Man kann erkennen, daß aktive Komponenten in den vereinigten Fraktionen 46 - 88 durch JCl, CH_2N_2, Ninhydrin, Fluorescamin, HCl, Pepsin und AcCh-esterase ganz bzw. teilweise inaktiviert werden. Die Aktivität der Fraktionen 100 - 111 bzw. 98 - 108 geht durch Behandlung mit Ninhydrin und Fluorescamin sowie durch Kochen in HCl oder NaOH verloren. Der positive Effekt von Pepsin und AcChE deuten daraufhin, daß in der Fraktion 46 - 88 womöglich mehrere Substanzen, darunter Proteine und AcCh, enthalten sind. Inkubation dieser Fraktion mit Zellen in Gegenwart des muskarinisch-cholinergen Antagonisten Atropin bestätigt die Anwesenheit von AcCh (Tab. 11). Wie noch gezeigt werden wird (s. S. 86) eluiert AcCh von der verwendeten Biogel P 4-Säule unerwartet früh zwischen Fraktion 60 und 70. Die AcCh-Rezep-

Tab. 10. Wirkung verschiedener Reagentien auf die den cyclo AMP-Spiegel absenkenden Substanzen aus Hybridzellextrakten

	Zugaben		cyclo AMP (pmol/mg Protein)	
PGE_1 (0.3/uM)	Fraktion	Reagenz	mit Reagenz	ohne Reagenz
a)				
+	-	-	1848 ± 280	
+	46-88	JCl	643 ± 172	262 ± 44
+	98-108	JCl	835 ± 140	743 ± 193
b)				
+	-	-	770 ± 46	
+	46-88	CH_2N_2	659 ± 99	113 ± 31
+	98-108	CH_2N_2	330 ± 123	694 ± 258
+	46-88	Pepsin	912 ± 41	474 ± 102
+	98-108	Pepsin	357 ± 48	348 ± 27
c)				
+	-	-	647 ± 63	
+	46-88	Ninhydrin	631 ± 13	63 ± 9
+	100-111	Ninhydrin	672 ± 61	184 ± 39
+	46-88	Fluorescamin	318 ± 79	128 ± 10
+	100-111	Fluorescamin	420 ± 127	174 ± 46
d)				
+	-	-	794 ± 107	
+	46-88	HCl	630 ± 146	176 ± 12
+	46-88	NaOH	228 ± 23	176 ± 12
+	98-108	HCl	1016 ± 105	260 ± 68
+	98-108	NaOH	1031 ± 63	260 ± 68
e)				
+	-	-	1035 ± 102	
+	66-82	AcChE	813 ± 42	596 ± 102
+	93-107	AcChE	362 ± 33	306 ± 36

a) 2.3×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (95 % Lebensfähigkeit, P 23).

b) 2.8×10^5 lebende Zellen (97 % Lebensfähigkeit, P 22).

c) 3.0×10^5 lebende Zellen (98 % Lebensfähigkeit, P 19).

d) 2.0×10^5 lebende Zellen (91 % Lebensfähigkeit, P 15).

e) 2.3×10^5 lebende Zellen (75 % Lebensfähigkeit, P 17).

Details der einzelnen Reaktionen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Bei a), b) und d) wurden identische Fraktionen verwendet.

Tab. 11. Einfluß von cholinergen Antagonisten auf die Wirkung der Fraktion 46-88 auf Hybridzellen

PGE_1 (0.3 µM)	weitere Zugaben	cyclo AMP (pmol/mg Protein)
-	-	14 ± 19
+	-	359 ± 61
+	46-88 (10 µl)	75 ± 7
+	AcCh (1 µM)	64 ± 12
+	AcCh+Atropin (1 µM)	293 ± 38
+	AcCh+D-Tubocurarin (1 µM)	45 ± 19
+	46-88 +Atropin	228 ± 45
+	46-88+D-Tubocurarin	52 ± 3

1.8×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 90 %, P 14). Fraktion 46-88 von Biogel P 4-Säule. Auftrag: Extrakt aus ca. 9×10^8 Hybridzellen (P 20, 92 Petrischalen). Endvolumen der Fraktion: 2 ml. Eingesetzt 10 µl in Verdünnung 1:5 ≙ ca. 9×10^5 extrahierten Zellen.

toren der Hybridzellen sind von muskarinischer Natur (78, 136). Atropin kann deshalb die Wirkung von AcCh und Fraktion 46-88 teilweise aufheben, während der nikotinisch-cholinerge Antagonist D-Tubocurarin ohne Effekt bleibt. Die Sensitivität der Fraktion 46-88 gegenüber JCl, Fluorescamin (=Fluram) und Pepsin wird vermutlich durch anwesende, den cyclo AMP-Spiegel ab-

senkende Proteine, die nach der Behandlung noch übrige Restaktivität wahrscheinlich durch AcCh hervorgerufen. Unter den Bedingungen der Ninhydrinreaktion wird die gesamte Aktivität zerstört (auch die von synthetischem AcCh). Durch HCl und CH_2N_2 werden ebenfalls alle aktiven Komponenten inaktiviert.

Einige Eigenschaften der Fraktion 98-108 seien noch erwähnt:

- Die Aktivität, den Anstieg des cyclo AMP-Spiegels zu blockieren, ist in Gegenwart von Atropin und dem α-adrenergen Antagonisten Phentolamin nicht geschwächt.
- Die aktive(n) Komponente(n) wird(werden) nicht von einem AG 1-X 8 - Anionenaustauscher zurückgehalten.
- Die aktive(n) Komponente(n) wird(werden) nicht oder nur schwach von einem Carboxymethylsephadex-Kationenaustauscher zurückgehalten.
- Die aktive(n) Komponente(n) kann(können) nicht mit Ether aus saurem, neutralem oder alkalischem Milieu extrahiert werden.
- In Gegenwart des Phosphodieesterase-Hemmers Isobutylmethylxanthin (IBMX) oder RO 20-1724 wird die Bildung von cyclo AMP sowohl in Hybridzellen als auch in C6-BU-1-Gliomazellen stimuliert (Tab. 12). Die C6-BU-1-Zellen werden nicht über ihren ß-adrenergen Rezeptor (137) stimuliert, da der Antagonist Propranolol die Stimulation nicht unterdrückt. Der Faktor, der die cyclo AMP-Bildung in Hybridzellen stimuliert, ist kein

Adeninnucleotid. Adenosin, AMP, ADP und ATP - nicht aber Adenin - erhöhen in Hybridzellen den cyclo AMP-Spiegel (78). Behandlung der Fraktion mit einer Mischung aus Hexokinase, Myokinase, 5'-Nucleotidase, Adenosindesaminase, Glucose und $MgCl_2$ inaktiviert die stimulierende Substanz nicht. Durch diese Mischung müßten die Adeninnucleotide in Inosin überführt werden.

- Behandlung der Fraktion mit 3', 5'-Phosphodiesterase ist ohne Effekt auf den stimulierenden Faktor.

Tab. 12. Einfluß der Biogel-P 4-Fraktion 98-108 auf den cyclo AMP-Spiegel von Hybrid- und Gliomazellen in Gegenwart von 500 µM IBMX

IBMX	weitere Zugaben	cyclo AMP/pmol/mg Protein 108CC15	C6-BU-1
-	-	7 ± 11	nicht meßbar
+	-	55 ± 16	16 ± 10
+	93-107 (10 µl)	277 ± 32	182 ± 33
+	Propranolol (10 µM)	nicht gemessen	1 ± 4
+	93-107+Propranolol	nicht gemessen	153 ± 39

108CC15: 1.3×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (95 % Lebensfähigkeit, P 18)

C6-BU-1 1.7×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (100 % Lebensfähigkeit, P 33)

Fraktion 93-107 von Biogel P 4-Säule: Auftrag: Extrakt aus ca. 1.2×10^9 Hybridzellen (P 16, 132 Petrischalen); 10 µl entsprechen einem Extrakt aus 3×10^6 Zellen.

Weitere Versuche zur Charakterisierung sowohl der den cyclo AMP-Spiegel absenkenden als auch der ihn erhöhenden Substanzen wurden an diesen Fraktionen nicht unternommen. Deshalb muß die Frage nach ihrer chemischen Natur offenbleiben. Eine der absenkenden Substanzen ist eventuell Phosphatidsäure. Kürzlich wurde berichtet, daß Phosphatidsäure in einer Fibroblastenzell-Linie die durch PGE_1 bedingte cyclo AMP-Erhöhung sehr effizient in submikromolaren Konzentrationen unterdrückt (138). Auch in C6-BU-1 Gliomazellen hemmt Phosphatidsäure den cyclo AMP-Anstieg (K. Wagner, persönliche Mitteilung).

Da die bisher untersuchten vereinigten Fraktionen offensichtlich mehrere aktive Komponenten enthalten, erschien es sinnvoll, jede Fraktion für sich auf ihre Fähigkeit zu testen, den cyclo AMP-Spiegel zu erniedrigen. Durch Verwendung von Hybrid- und Gliomazellen in Parallelversuchen sollten mögliche Spezifitätsunterschiede zum Ausdruck kommen. Abb. 30 zeigt ein typisches Fraktionsmuster. Mehrere Aktivitätsgipfel sind zu erkennen. Gipfel I, II, III, IV, VI hemmen bevorzugt bei Hybridzellen den Anstieg der cyclo AMP-Konzentration. Gipfel III wird durch AcCh hervorgerufen (Effekt durch Atropin hemmbar). Außerdem eluiert ^{3}H-AcCh in genau derselben Position. Obwohl C6-BU-1-Gliomazellen AcCh-Rezeptoren besitzen (139), sind diese doch nicht mit der Adenylatcyclase gekoppelt. Deshalb kann durch AcCh in diesen Zellen keine Hemmung beobachtet werden. Keiner der Aktivitätsgipfel

bei Verwendung der Hybridzellen wird durch die Gegenwart des Opioidantagonisten Naloxon verkleinert. ^{3}H-Leu-Enkephalin eluiert von einer neu gegossenen Biogel P 4-Säule zusammen mit Gipfel VI (bei älteren Säulen: s. Kap. II. 2.1.). Die Substanzen in Gipfel I eluieren im Ausschlußvolumen der Säule. Auf dieses Material wird später noch besonders eingegangen (Kapitel IV, S.176). Es sei jedoch vorweggenommen, daß bei höherer Konzentration diese Fraktionen auch in C6-BU-1-Zellen den cyclo AMP-Spiegel erniedrigen können. Außer AcCh wurde, wie schon im vorangegangenen Kapitel erwähnt, keine der die Hemmung verursachenden Substanzen weiter identifiziert. Auf die Abtrennung von Opioidpeptiden wird im übernächsten Kapitel (II. 2. ff.) eingegangen.

II. 1.4. Vergleich von Biogel P 4-gereinigten Extrakten verschiedener Herkunft mit Hybridzellextrakten im cyclo AMP-Test.

In Abb. 28 (S. 74) wurde gezeigt, daß auch ein Extrakt aus C6-BU-1-Gliomazellen den Anstieg des cyclo AMP-Spiegels in Hybridzellen hemmen kann. Ergeben sich nun nach gelchromatographischer Auftrennung eines solchen Extraktes Parallelitäten zum Fraktionsmuster des Hybridzellextraktes (Abb. 30)? Abb. 31 zeigt das Ergebnis eines im Prinzip gleichen Versuchs wie oben beschrieben. Erwartungsgemäß fehlt der AcCh-Gipfel, da diese Zellen keine Cholinacetyltransferaseaktivität enthalten (75). Außerdem ist der dem AcCh-Gipfel links benachbarte Gipfel II

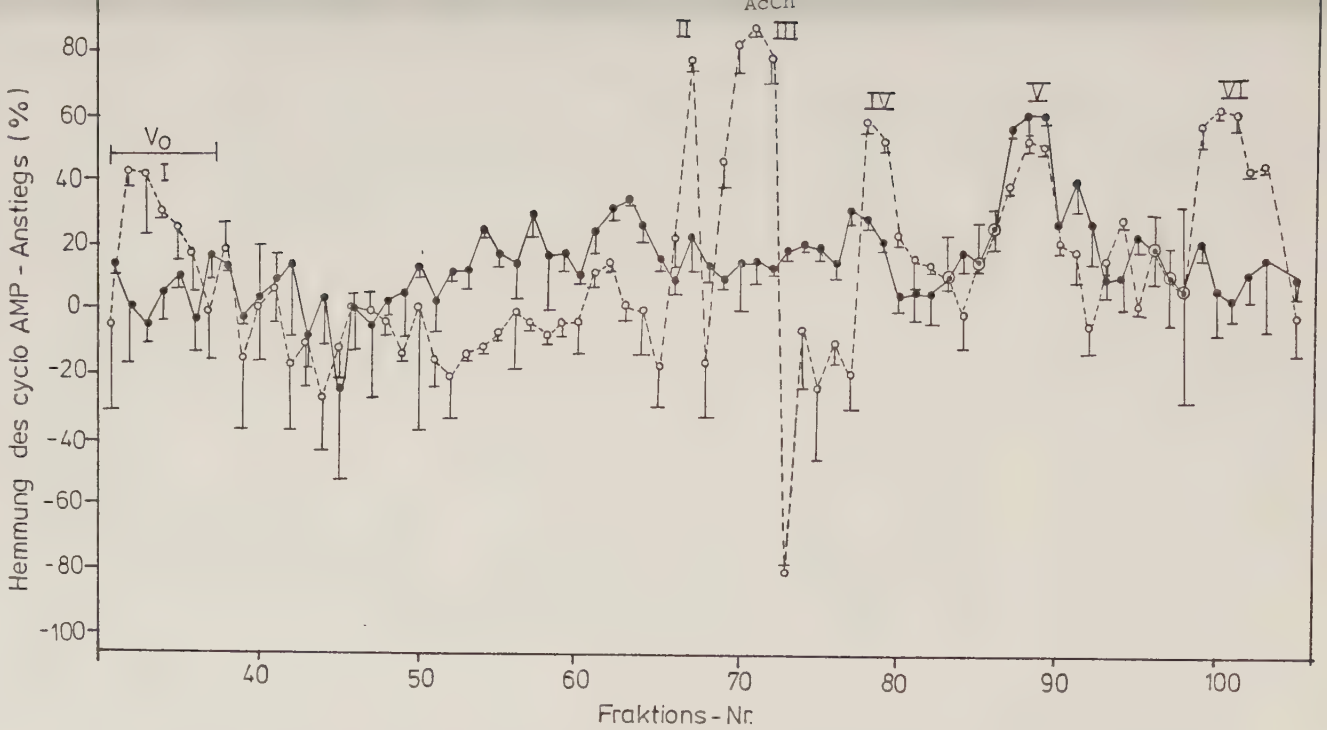


Abb. 30. Wirkung einzelner nach Chromatographie eines Hybridzellextraktes an einer Biogel P 4-Säule erhaltener Fraktionen auf den cyclo AMP-Gehalt von Hybrid- und Gliomazellen.

1.3×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 86 %, P 16), maximaler cyclo AMP-Wert 350 ± 11 pmol/mg Protein, bzw. 6.3×10^5 lebende Gliomazellen (Lebensfähigkeit 99 %, P 30), maximaler cyclo AMP-Wert 1920 ± 210 pmol/mg Protein.

Auftrag: Extrakt aus ca. 8×10^8 Hybridzellen (P 16, 99 Petrischalen); Säulenmaße und Elutionsbedingungen s. Legende zu Abb. 29.

Hybridzellen o--------o; Gliomazellen •————•.

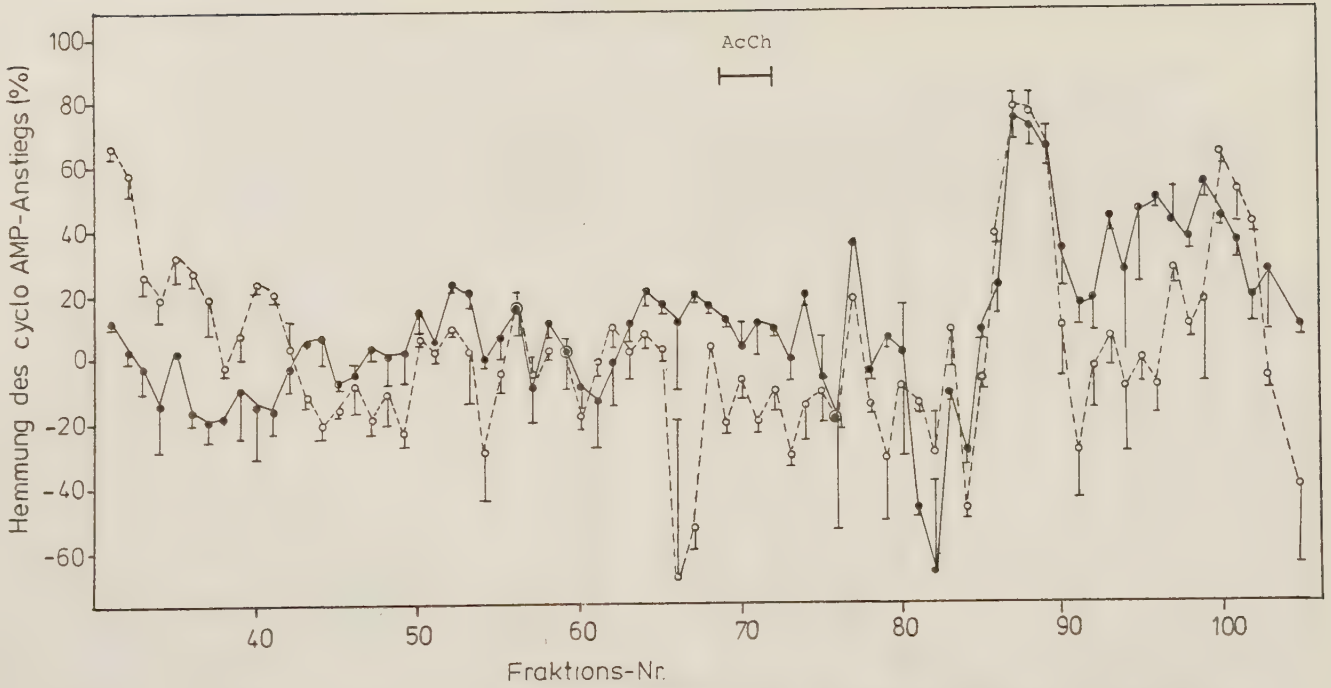


Abb. 31. Wirkung einzelner nach Chromatographie eines Gliomazellextraktes an einer Biogel P 4-Säule erhaltener Fraktionen auf den cyclo AMP-Gehalt von Hybrid- und Gliomazellen.

1.3×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 80 %, P 16), maximaler cyclo AMP-Wert 518 ± 46 pmol/mg Protein bzw. 4.2×10^5 lebende Gliomazellen (Lebensfähigkeit 99 %, P 29), maximaler cyclo AMP-Wert 1210 ± 30 pmol/mg Protein.

Auftrag: Extrakt aus ca. 2.4×10^9 Gliomazellen (P 47, 39 Petrischalen); Chromatographiebedingungen s. Legende zu Abb. 29. /

Hybridzellen o--------o; Gliomazellen ●————● .

Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels bei Gliomazellen durch 100 /uM NA.

(s. Abb. 30) im Gliomazellextrakt nicht vorhanden. Das übrige Erscheinungsbild ist weitgehend identisch, mit der Ausnahme, daß im Gliazellextrakt zwischen Fraktion 90 und 100, getestet auf Gliazellen, höhere Hemmaktivität gefunden wird. Da außer den in Kap. IV erwähnten keine weitergehenden, vergleichenden Studien unternommen wurden, bleibt zu klären, ob die hemmenden Substanzen aus Hybrid- und Gliomazellen identisch sind oder nicht.

Zellen in Kultur brauchen zum Überleben und Wachsen Serum bzw. einen Serumersatz. Unsere Zellen werden meist in Gegenwart von fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) kultiviert, nur für Spezialversuche in Gegenwart eines Mediums, das eine spezielle Hormonmischung enthält (N2-Medium; Ref. 140). Da die Zellen also in Gegenwart von FCS wachsen, könnten sie Substanzen daraus aufgenommen haben. Deshalb wurde zum Vergleich Serum genauso bearbeitet wie die Zellextrakte. Nur wurden vor der Gelchromatographie die Serumproteine durch Trichloressigsäure ausgefällt. Wie aus Abb. 32 zu erkennen ist, wird wiederum in den Fraktionen zwischen 80 und 110 sehr starke Hemmaktivität beobachtet. Es könnte also durchaus sein, daß die bzw. einige der in diesem Bereich eluierenden Substanzen der Extrakte aus dem Serum stammen.

Injektion von Hybridzellen in athymische, sogenannte "nackte" Mäuse führt zur Bildung großer Tumoren, die ausschließlich aus Hybridzellen bestehen (141). Die

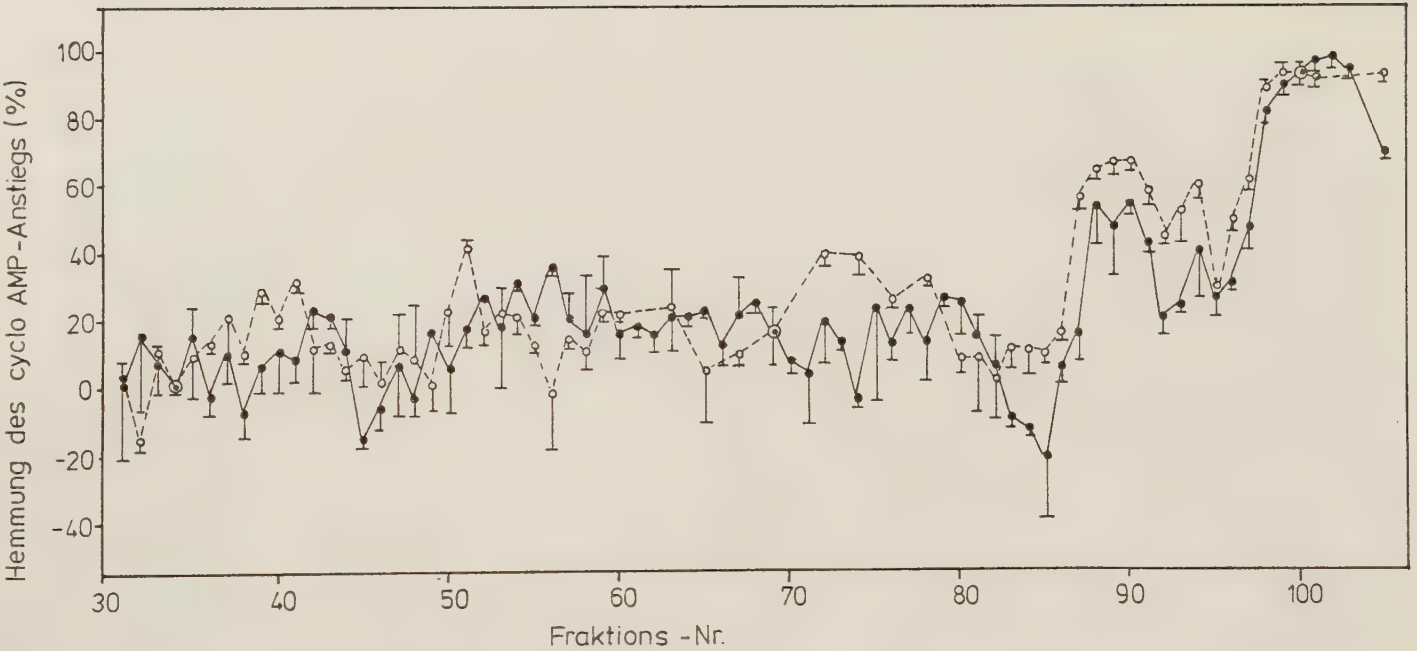


Abb. 32. Wirkung einzelner nach Chromatographie von FCS an einer Biogel P 4-Säule erhaltener Fraktionen auf den cyclo AMP-Gehalt von Hybrid-und Gliomazellen. FCS (100 ml) wurde extrahiert wie im Experimentellen Teil beschrieben.

1.9×10^5 lebende Hybridzellen (Lebensfähigkeit 96 %, P 15), maximaler cyclo AMP-Wert 480 ± 52 pmol/mg Protein bzw. 4×10^5 lebende Gliomazellen (Lebensfähigkeit 99 %, P 28), maximaler cyclo AMP-Wert 1600 ± 280 pmol/mg Protein. Chromatographiebedingungen s. Legende zu Abb. 29.
Hybridzellen o-------o; Gliomazellen ●——●.
Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels durch 0.3 /uM PGE_1 (Hybridzellen) bzw. 100 /uM NA (Gliomazellen).

Eigenschaften der Hybridzellen in den Tumoren sind, so weit untersucht, nicht verändert (141). Große Mengen an Zellmaterial können auf diese Weise erhalten werden. Da für eine Anreicherung von Faktoren aus Hybridzellen möglicherweise viel Ausgangsmaterial notwendig ist, wurden Extrakte aus Hybridzelltumoren in ähnlicher Weise fraktioniert und gemessen wie die oben erwähnten. Das Fraktionsmuster ist sehr ähnlich dem für in vitro gezüchtete Hybridzellen erhaltenen (s. Abb. 30). Ein entsprechendes Diagramm wird deshalb nicht gezeigt. Es kann aber wiederum, wie schon für die Zellen in Kultur, nicht ausgeschlossen werden, daß die Substanzen aus der Umgebung (diesmal aus dem Blut der Wirtsmäuse) aufgenommen wurden. Zum Vergleich wurden auch Extrakte aus Rattengehirnen untersucht. Das qualitativ gleiche Erscheinungsbild wird dabei erhalten. Da aus Zeitgründen keine nichtneuronalen Gewebe oder Zellen auf ähnliche Weise aufgearbeitet wurden, kann über die Spezifität der beobachteten Faktoren für neuronale Zellen nichts ausgesagt werden, geschweige denn über irgendeine physiologische Signifikanz.

II. 2. Studien zur Reinigung von Opioidpeptiden aus Hybridzellextrakten.

Trotz der Anwesenheit so vieler verschiedener Faktoren in den Hybridzellextrakten, beinhalten die in Abb. 28 gezeigten Daten mit Rohextrakten aber immer noch die Möglichkeit, daß auch Opioide zugegen sind. Es gibt

keinen Hinweis für die Anwesenheit von ß-Endorphin in den Extrakten. ß-Endorphin inhibiert die Bindung von ^{3}H-Naloxon an Hybridzellmembranen mit einem IC_{50}-Wert von 40 nM (s. Abb. 21). Für die Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs wird dagegen ein IC_{50}-Wert von 7 nM beobachtet (87, 118). Im Bindungstest werden also höhere ß-Endorphinkonzentrationen benötigt als im cyclo AMP-Test, um einen Effekt zu erzielen. Wenn der Rohextrakt die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Hybridzellmembranen hemmt, weil ß-Endorphin zugegen ist, so müßte dieses ß-Endorphin erst recht im cyclo AMP-Test (wegen dessen höherer Sensitivität) nachweisbar sein. Naloxon-sensitive Hemmung des Anstiegs des cyclo AMP-Spiegels müßte bei einem über Biogel P 4-gereinigtem Extrakt zwischen den Fraktionen 30 und 40 (geprüft mit authentischem ß-Endorphin) zu beobachten sein. Dies aber ist nicht der Fall. Der Effekt des Rohextraktes auf die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an ein spezifisches Antiserum (s. Abb. 28 B) kann wegen fehlender Kreuzreaktivität (s. I.3. S. 63) nicht durch ß-Endorphin bedingt sein. Es wurde deshalb nach der Existenz von Enkephalinen in den Hybridzellextrakten gesucht.

II. 2.1. Reinigung mittels Gelchromatographie

Wie schon erwähnt (S. 77), eluiert ^{3}H-Leu-Enkephalin zwischen Fraktion 100 und 110 von einer Biogel P 4-Säule. Da in diesem Bereich aber sehr viele andere Bestandteile der Extrakte eluieren, ist eine Unter-

suchung dieser Fraktionen auf Enkephalingehalt nicht sinnvoll. Es war aber beobachtet worden, daß bei einer seit längerer Zeit in Betrieb befindlichen Biogel P 4-Säule sich das Elutionsvolumen von ^{3}H-Leu-Enkephalin stark vergrößert hat (nun zwischen Fraktion 120 und 130), ohne daß sich das UV-Extinktions- und Aktivitätsmuster der Extrakte verändert hätten. Wahrscheinlich ist eine sich langsam einstellende dichtere Packung der Säule die Ursache. Warum aber die anderen Substanzen nicht davon betroffen werden, bleibt unklar. Abb. 33 zeigt, daß sich die Verschiebung der Elutionsposition von ^{3}H-Leu-Enkephalin graduell einstellt. Nach ca. 5 Wochen eluiert ^{3}H-Leu-Enkephalin zwischen Fraktion 120 und 130. Diese Position bleibt dann unverändert. Da sich das Elutionsverhalten anderer, die Tests störender Substanzen nicht verändert, werden jetzt eventuell in den Extrakten enthaltene Enkephaline davon abgetrennt. Die Elutionsposition von Enkephalinen in Extrakten wird durch vorherigen Zusatz von 6.5×10^{4} dpm ^{3}H-Leu-Enkephalin bestimmt. Aus der Menge der Radioaktivität, die nach der Reinigung noch gefunden wird, kann gleichzeitig die Ausbeute bestimmt werden. Einzelfraktionen eines gereinigten Extraktes enthalten wenig opioidaktives Material (Abb. 34 A). Die Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs (A, Kurve a) ist zwar gering, wird aber in Fraktion 127 - 129 durch gleichzeitige Anwesenheit von Naloxon (Kurve b) aufgehoben. Die Form des Aktivitätsgipfels entspricht der Form des Radioaktivitätsgipfels (Kurve c).

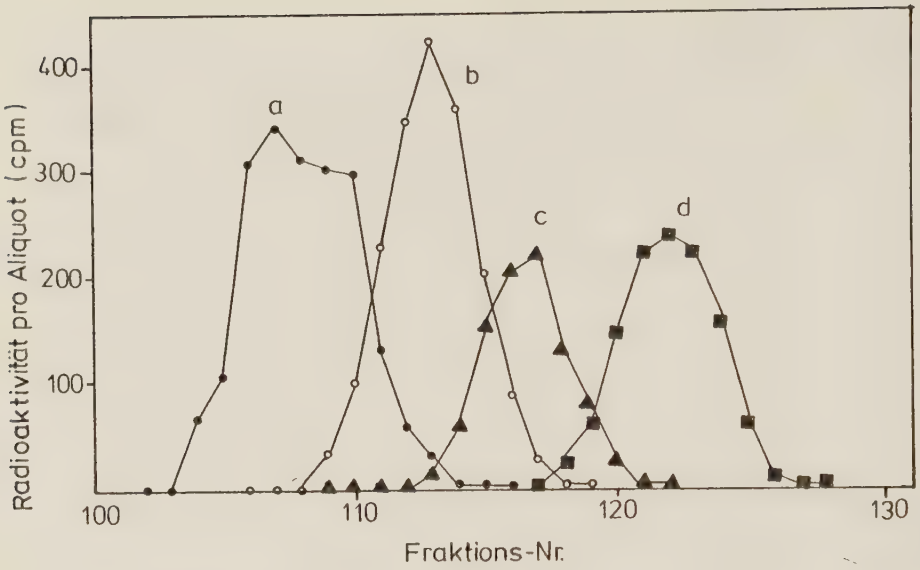


Abb. 33. Einfluß des Alters einer Biogel P 4-Säule auf das Elutionsverhalten von ^{3}H-Leu-Enkephalin.

Säule: 100 x 4 cm, Elutionsgeschwindigkeit 92 ml/h
Auftrag: 6.5 x 10^{4} bis 1 x 10^{5} dpm ^{3}H-Leu-Enkephalin.
Fraktionsvolumen 10 ml, gemessenes Aliquot 0.75 ml ; Alter der Säule (Tage): a: 7, b: 24, c: 31, d: 37. Ab 24 Tagen ist die Säule ununterbrochen benützt worden.

In einem weiteren Experiment werden die radioaktives Leu-Enkephalin enthaltenden Fraktionen vereinigt, lyophilisiert und wieder gelöst. Diese Lösung wird auf die Fähigkeit hin überprüft, den durch PGE_1 bedingten Anstieg des cyclo AMP-Spiegels in An- und Abwesenheit von Naloxon abzusenken (Abb. 34 B). In Gegenwart von Naloxon (Kurve b) wird deutlich schwächere Hemmaktivität gefunden. Das weist wiederum auf die Anwesenheit von

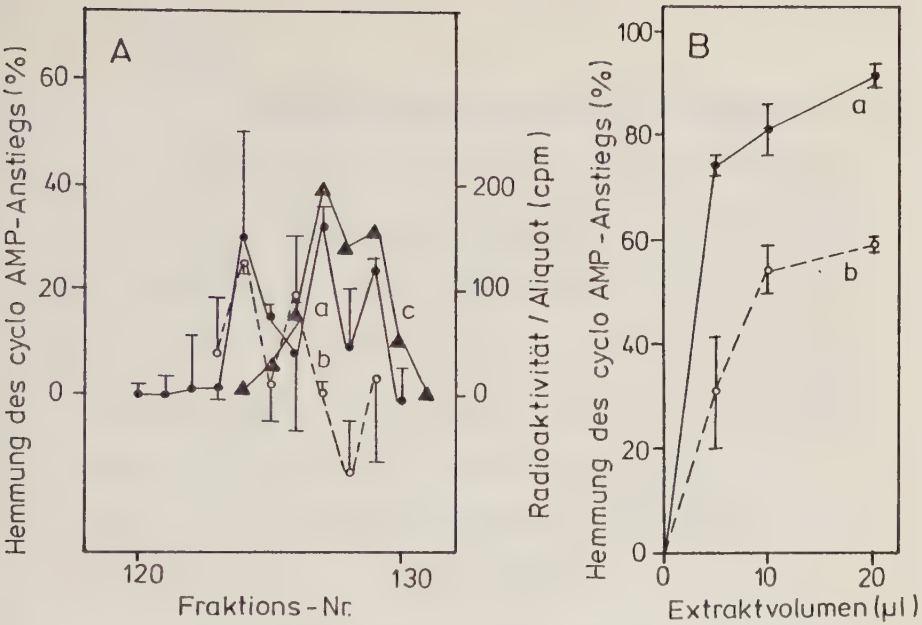


Abb. 34. Überprüfung von Einzelfraktionen (A) bzw. vereinigten Fraktionen (B) von Biogel P 4-gereinigten Extrakten auf den Gehalt von Opioiden.

A: 1.1 x 10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 75 %, P 16); maximaler cyclo AMP-Wert 338 ± 48 pmol/mg Protein.
Auftrag: Extrakt aus ca. 4.5 x 10^8 Zellen (P 16, 61 Petrischalen); Endvolumen der Fraktionen 150 µl. Je 20 µl wurden in den Test eingesetzt. Kurve a: ohne, Kurve b: mit 10 µM Naloxon, Kurve c: Radioaktivität

B: 1.2 x 10^5 lebende Hybridzellen (Lebensfähigkeit 90 %, P 16); maximaler cyclo AMP-Wert 963 ± 151 pmol/mg Protein.
Auftrag: Extrakt aus ca. 1.3 x 10^8 Zellen (P 15,15 Petrischalen); Endvolumen 200 µl. Kurve a: ohne, Kurve b: mit 10 µM Naloxon.

Opioden hin. Aber noch weitere, ebenfalls den cyclo AMP-Anstieg hemmende Faktoren scheinen zugegen zu sein. Zusätzliche Reinigungsschritte sind also nötig.

II. 2.2. Reinigung mittels Adsorptionschromatographie

Polystyrolcopolymere sind zur Adsorption verschiedener hydrophober Materialien verwendet worden. So z. B. für die Adsorption von Dinitrophenylderivaten von Aminosäuren (142), von Phenylalanin (142) oder von Triton X-100 aus Proteinlösungen (143). Die verschiedenen Substanzen werden durch hydrophobe Wechselwirkungen festgehalten. Auch Met- und Leu-Enkephalin als hydrophobe Peptide adsorbieren in wässriger Lösung an solche Polystyrol-Kügelchen (144). Sie können mit ethanolischer Lösung wieder eluiert werden. Das Polystyrolmaterial ist von verschiedenen Firmen erhältlich. In der vorliegenden Arbeit wurden die der Fa. Biorad mit dem Namen "Bio-beads" verwendet. Deshalb werden im Folgenden die Polystyrolkügelchen nur noch als Bio-beads (BB) bezeichnet. Zur Anreicherung von Enkephalinen aus verschiedenen Geweben wurde die Verwendung eines ähnlichen Materials beschrieben (63). Wird ein Extrakt über Bio-beads gereinigt und das ethanolische Eluat auf Opioidaktivität zunächst im RIA untersucht, erhält man das in Abb. 35 gezeigte Diagramm. Zusammen mit ^{3}H-Leu-Enkephalin eluiert bei Ethanolzugabe Material (11 % der aufgetragenen Proteinmenge), das mit dem Antiserum kreuzreagieren kann. Aus der Menge des extrahierten Proteins errechnet sich bei Berücksichtigung der Ausbeute ein Opioidgehalt von 0.2 pmol/mg Protein. Um einen Hinweis zu erhalten, ob es sich tatsächlich um Opioide handelt, wurde der Rest der Fraktionen vereinigt, lyophilisiert, aufge-

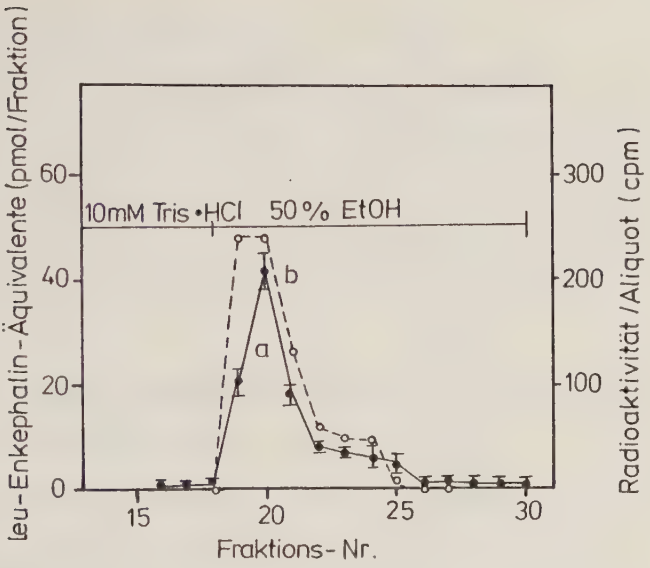


Abb. 35. Überprüfung eines ethanolischen Eluats von Biobeads auf den Gehalt von Opioiden mittels des radioimmunologischen Tests.

Auftrag: Extrakt aus ca. 5.2 x 10^8 Zellen (P 21, 63 Petrischalen); Endvolumen der Fraktionen 150 µl. Davon werden 30 µl für den Test (Kurve a) bzw. 10 µl zur Radioaktivitätsmessung (Kurve b) eingesetzt.

nommen und in Ab- und Anwesenheit von Naloxon in den cyclo AMP-Test eingesetzt (Abb. 36). Die starke Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs kann durch Naloxon nur teilweise aufgehoben werden. Andere, ebenfalls den cyclo AMP-Spiegel absenkende, möglicherweise im RIA kreuzreagierende Substanzen, scheinen noch enthalten zu sein. Es kann deshalb nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die mit dem RIA bestimmten Opioidmengen richtig sind. Erst wenn mit beiden Tests übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden, kann man davon ausgehen, wahrscheinlich realistische Werte gemessen zu haben. Deshalb ist

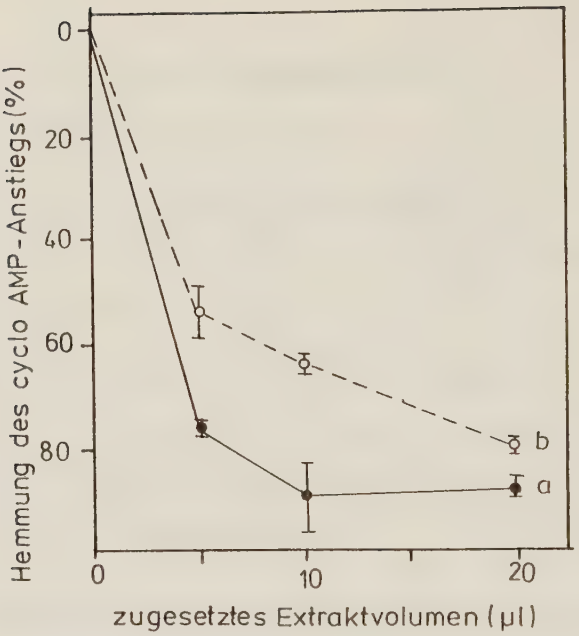


Abb. 36. Überprüfung des ethanolischen Eluats aus mit Zellextrakt beladenen Bio-beads auf den Gehalt an Opioiden; Cyclo AMP-Test in Abwesenheit (Kurve a) und Anwesenheit (Kurve b) von 10 µM Naloxon.
1.8×10^5 lebende Zellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 94 %, P 14). Maximaler cyclo AMP-Wert 264 ± 3 pmol/mg Protein. Der Rest der in der Legende zu Abb. 35 erwähnten Fraktionen (80 µl) war vereinigt und auf 200 µl eingeengt worden.

die Adsorptionschromatographie an Bio-beads, wie schon die Gelchromatographie an Biogel P 4, als einziger Reinigungsschritt nicht ausreichend, um Opioide eindeutig aus Hybridzellextrakten abzutrennen. Die Kombination mit einer oder mehreren anderen Reinigungsmethoden erscheint notwendig.
Im Gegensatz zu Hybridzellextrakten werden aus Meerschwein-

chen-Ileum oder -Gehirnextrakten durch Chromatographie an Bio-beads-ähnlichem Material die Enkephaline in "biologisch reiner"Form abgetrennt, d. h. die Opioidaktivität im Maus-vas deferens-System wird vollständig durch Naloxon aufgehoben (63). Andere, opioidinaktive Komponenten sind freilich auch hier noch zugegen.

II. 2.3. Kombination zweier Reinigungsschritte zur Abtrennung von Opioiden aus Zellextrakten.

Die Verwendung von Kationen- und Anionenaustauschern zur Reinigung von Enkephalinen ist beschrieben worden (145). Es wurde deshalb versucht, einen über Bio-beads vorgereinigten Extrakt über eine Biorad AG 1-X 8 - Anionenaustauschersäule weiter zu reinigen. Vorlauf und Eluat wurden im RIA sowie im cyclo AMP-Test auf Opioidaktivität untersucht (Tab. 13). Im Vorlauf (mit 0.1 M NH_4AcO, pH 8.0) wie auch im Eluat (mit 0.1 M AcOH) werden mittels des RIA Leu-Enkephalin-Äquivalente nachgewiesen. Die gleichen Fraktionsvolumina wurden außerdem auf die Fähigkeit hin untersucht, den cyclo AMP-Spiegel in Hybridzellen abzusenken. Beim Vorlauf war das wegen Zellablösung nicht möglich. Im Eluat wird eine 45%ige Hemmung gefunden, die zum Teil durch Naloxon aufgehoben wird. Die im RIA gemessenen 1.53 ± 0.22 pmol/20 µl Enkephalinäquivalente im Eluat sollten aber, da sie bei 300 µl Inkubationsvolumen im cyclo AMP-Test einer Enkephalinkonzentration von 4-5 nM entsprechen, mindestens eine Hemmung von 70 % erbringen (siehe Tab. 13). Das aber ist nicht der Fall.

Tab. 13. Opioidaktivität in Extrakten gereinigt durch Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie

Zugabe (/uM)	RIA (pmol)	% Hemmung der cyclo AMP-Bildung
20/ul Vorlauf	1.13 ± 0.19	wegen Ablösung der Zellen von der Kulturschale nicht bestimmbar
20/ul Eluat	1.53 ± 0.22	45 ± 2
Eluat+Naloxon(10)	-	20 ± 1
Leu-Enkephalin (0.0001)	-	33 ± 1
Leu-Enkephalin (0.001)	-	57 ± 2
Leu-Enkephalin (0.01)	-	88 ± 2

1.6×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 90 %, P 19); maximaler cyclo AMP-Wert: 979 ± 157 pmol/mg Protein. Der Extrakt (aus ca. 1.8×10^8 Hybridzellen, P 17, 22 Petrischalen) wurde nach ethanolischer Elution von Bio-beads auf eine AG 1-X 8-Säule (20 x 1 cm) aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 0.1 M NH_4AcO wird mit 0.1 M AcOH eluiert. Nach Vereinigung und Lyophilisation des Eluats wird der Rückstand in 200/ul Puffer aufgenommen. Das Inkubationsvolumen im cyclo AMP-Test beträgt 300/ul.

Deshalb scheinen andere Substanzen im RIA kreuzzureagieren. Die Reinigung über einen Anionenaustauscher unter den benutzten Bedingungen erscheint folglich nicht sinnvoll.

Da die Enkephaline hydrophobe Peptide sind, könnte eine Reinigung mittels Verteilungschromatographie an Sephadex LH-20 erfolgreich sein. An Sephadex LH-20 konnte von D. van Calker Leu-Enkephalin von seinem Dijod-analogon getrennt werden (85). Ein typisches UV-Extinktionsdiagramm für die Chromatographie

eines über Bio-beads vorgereinigten Extraktes an Sephadex LH-20 ist in Abb. 37 gezeigt. ^{3}H-Leu-Enkephalin eluiert in Fraktion 60 bis 67. In den Fraktionen 21 - 58 eluieren 61 % der aufgetragenen Proteinmenge, je 10 % in den Fraktionen 59 - 68 (Enkephalinfraktion) und den restlichen Fraktionen bis Nummer 110. Werden die Fraktionen 59 - 68 ver-

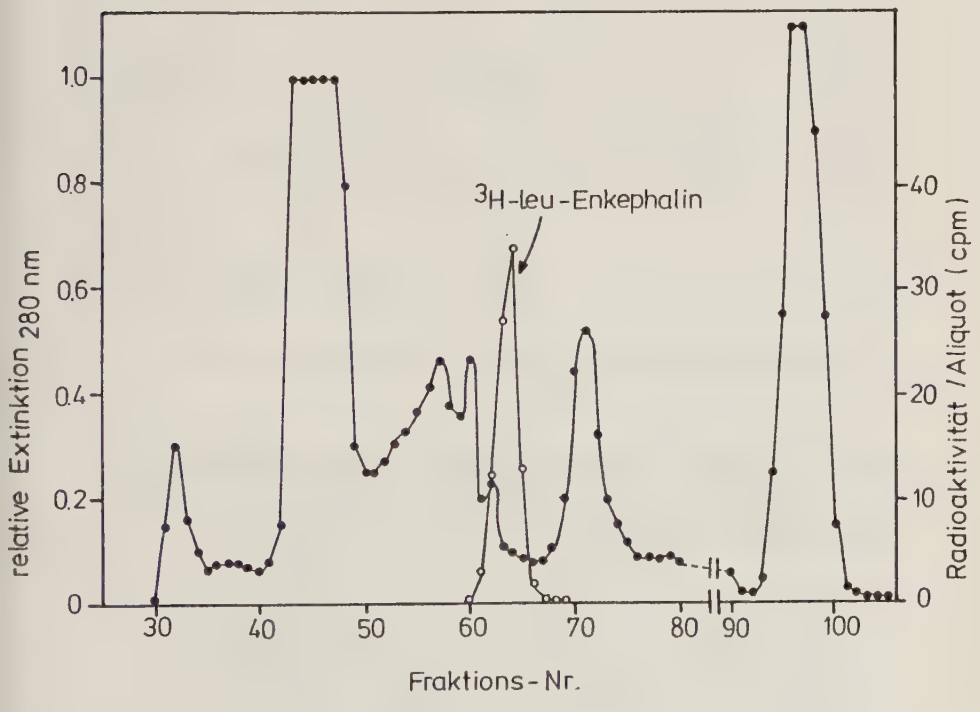


Abb. 37. Verfolgung der Reinigung eines über Bio-beads vorgereinigten Extraktes an Sephadex LH-20 mittels Messung der Extinktion bei 280 nm.

Säule: 100 x 1 cm, Flußgeschwindigkeit 3.8 ml/h. Elutionsmittel 0.1 M AcOH. Fraktionsvolumen 0.8 - 1.0 ml
Auftrag: Extrakt aus ca. 8.5 x 10^{7} Hybridzellen (P 16, 12 Petrischalen).
^{3}H-Leu-Enkephalin o_____o (10 µl der 0.8 ml Fraktion).

einigt, eingeengt und auf ihren Opioidgehalt hin in den drei verschiedenen Testsystemen untersucht, erhält man das in Abb. 38 gezeigte Diagramm. Der Anstieg des cyclo AMP-Spiegels wird stark gehemmt (A, Kurve a). Naloxon hebt die Hemmung nahezu vollständig auf (A, Kurve b). Die Bindung von ^{3}H-Naloxon an Hybridzellmembranen wird durch die Anwesenheit des partiell gereinigten Extraktes ebenfalls unterdrückt (B, Kurve a). Auch im dritten Testsystem, dem RIA, (B, Kurve b) wird Aktivität gefunden. Mehrere Gründe sprechen dafür, daß es sich bei der(den) aktiven Substanz(en) um Enkephaline und nicht um ß-Endorphin handelt:

a) ß-Endorphin zeigt keine Kreuzreaktivität im RIA (s. Kapitel I.3. S. 63).

b) ß-Endorphin bindet irreversibel an vernetzte Polystyrolkügelchen (63).

c) Wird der partiell gereinigte Extrakt noch über Biogel P 4 gereinigt, eluiert die Opioidaktivität in der Enkephalin- und nicht der ß-Endorphinfraktion.

d) ß-Endorphin ist im Bindungstest weniger potent als im cyclo AMP-Test. Der partiell gereinigte Extrakt aber ist in beiden Systemen gleich aktiv.

Mit Leu-Enkephalin als Standard errechnen sich aus cyclo AMP- und Bindungstest 2.5 - 3.0 pmol/10/ul. Aus dem RIA dagegen ergibt sich ein Wert von 1.8 pmol/10/ul. Diese Diskrepanz könnte durch gleichzeitige Anwesenheit von Met- und Leu-enkephalin-ähnlichem Material in den Extrakten erklärt

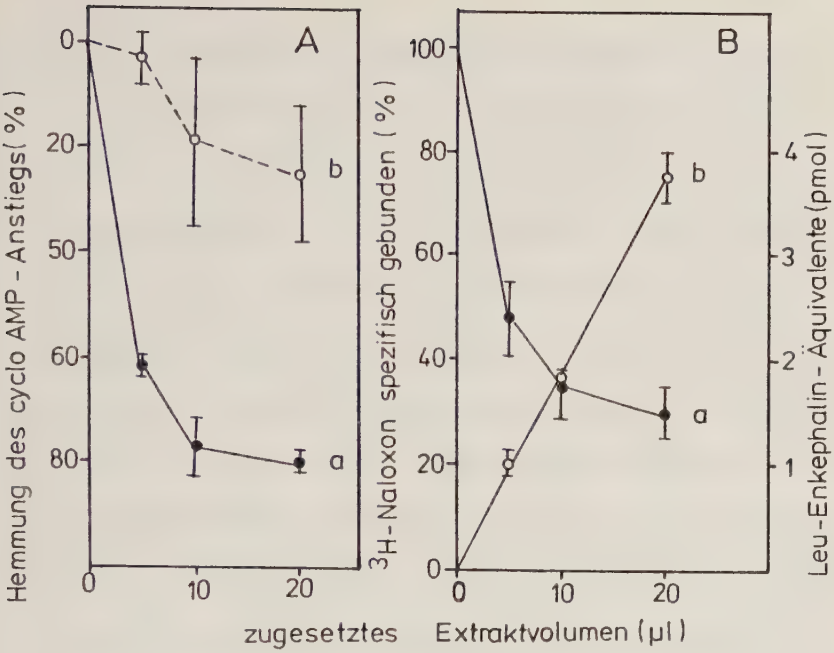


Abb. 38. Effekt von partiell gereinigtem Hybridzellextrakt auf den cyclo AMP-Spiegel in Abwesenheit (A, Kurve a) und Anwesenheit (A, Kurve b) von 10 µM Naloxon, auf die Bindung von ^{3}H-Naloxon an Hybridzellmembranen (B, Kurve a) und von ^{3}H-Leu-Enkephalin an spezifische Antikörper (B, Kurve b).

1.6×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 85 %, P 11); maximaler cyclo AMP-Wert 387 ± 3 pmol/mg Protein. Konzentration an ^{3}H-Naloxon 16 nM; 0.56 mg Protein pro Ansatz. Verdünnung des Antiserums 1:200.
Der partiell (über BB und LH-20) gereinigte Extrakt (310 µl) stammt aus ca. 5.1×10^8 Hybridzellen (P 18, 59 Petrischalen).

werden. In Kapitel II. 3.2. (S. 111) wird gezeigt, daß dies der Fall ist. Im cyclo AMP- und Bindungstest sind Met- und Leu-Enkephalin gleich aktiv. Im RIA dagegen werden nur 30 %

des anwesenden Met-Enkephalins gemessen (s. Kapitel I. 3., Seite 63). Wie in Kapitel II. 3.2. (S.111) gezeigt wird, ist in den Hybridzellextrakten ca. dreimal mehr Met- als Leu-Enkephalin enthalten. Die im RIA gefundenen Werte müssen unter der Annahme, daß die Ausbeuten für beide Enkephaline gleich sind, mit dem Faktor 2 multipliziert werden. Der so korrigierte Wert von 3.6 pmol/10/ul ist höher als die in den anderen Tests bestimmten. Wenn die Ausbeute für Met-enkephalin-ähnliches Material schlechter als die für Leu-enkephalin-ähnliches ist, würde durch die Multiplikation der im RIA bestimmte Wert höher werden als er tatsächlich ist. Das könnte hier der Fall sein. Die Ausbeute wird nur mit ^{3}H-Leu-Enkephalin bestimmt. Da es weder ^{14}C-markiertes Leu- noch Met-Enkephalin zu kaufen gibt, muß unter den vorliegenden Bedingungen auf die gleichzeitige Bestimmung der Ausbeute beider Enkephaline verzichtet werden.

Aus dem Wert 3 pmol/10/ul Enkephalinäquivalente läßt sich unter Berücksichtigung des Volumens, der Ausbeute an ^{3}H-Leu-Enkephalin und der Proteinmenge, aus der der Extrakt hergestellt wurde, ein Gehalt an enkephalin-ähnlichem Material von 0.3 pmol/mg Protein berechnen. Im Rattengehirn wird ein Durchschnittswert von etwa 2 pmol Gesamtenkephalin/mg Protein gefunden (63). Die Konzentrationen von Region zu Region variieren aber sehr stark (63). Die in den Hybridzellen enthaltenen Opioidmengen sind also vergleichsweise gering. Die Gesamtmenge an zugesetztem ^{3}H-Leu-Enkephalin (6.5×10^{4}dpm $\triangleq$ ca. 0.8 pmol) ist zu gering, als daß sie die Testergebnisse verfälschen könnte (im Test $<$ 0.1 pmol).

Da nach Reinigung der Extrakte über Bio-beads und Sephadex LH-20 mit allen drei Tests übereinstimmende Opioidaktivität nachweisbar ist, werden alle weiteren Extrakte - sofern nicht ausdrücklich erwähnt - auf diese Weise vorgereinigt (im folgenden partiell gereinigte Extrakte genannt). Durch Kombination von Gelchromatographie an Biogel P 4 und an Bio-beads werden ebenfalls nahezu alle die Tests störenden Komponenten abgetrennt. Die Chromatographie von Homogenaten aus Meerschweinchen-Striatum an Sephadex LH-20 zur Isolierung von Enkephalinen wurde inzwischen beschrieben (146).

Die Mengen an enkephalin-ähnlichen Substanzen in Extrakten wurden im Folgenden meist mittels des RIA quantitativ bestimmt. Im RIA kann im Gegensatz zum cyclo AMP- und Rezeptorbindungstest die Eichkurve mit Leu-Enkephalin linearisiert werden. Deshalb können mit dem RIA die Opioidkonzentrationen genauer ermittelt werden als mit den beiden anderen Tests. Die mit Hilfe des RIA ermittelten Opioidkonzentrationen sind aber aus den oben erwähnten Gründen nicht die wahren Konzentrationen, sondern müssen - unter der Annahme gleicher Ausbeuten für Met- und Leu-Enkephalin - mit dem Faktor 2 multipliziert werden. Die mit Hilfe des RIA gefundenen Werte wurden bei den meisten Extrakten mittels des cyclo AMP-Test in An- und Abwesenheit von Naloxon kontrolliert.

II. 2.4. Vergleich verschiedener Methoden der Extraktion von Opioiden aus Hybridzellen

In der Literatur beschriebene Methoden zur Extraktion von Enkephalinen umfassen die Homogenisation von Geweben in 0.1 M HCl (63), 2.5 M AcOH (146) oder 1 M AcOH (147). Ebenfalls zur Extraktion von Enkephalinen wurden 0.4 M Perchlorsäure (148), 1 M AcOH + 0.02 M HCl + 0.1 % 2-Mercaptoethanol + 1 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (149) und Methanol (nach Kochen eines Homogenats) (150) verwendet. Es muß unter Bedingungen extrahiert werden, unter denen kein proteolytischer Abbau der Enkephaline stattfindet. Enkephalinabbauende Enzyme aus verschiedenen Geweben sind beschrieben worden (151 - 155). In Rattenhirnmembranen sind zwei verschiedene spezifische Enkephalinasen vorhanden, die durch Chelatagentien wie EDTA inhibiert werden (156). In Gegenwart des Peptidantibioticums Bacitracin wird der enzymatische Abbau der Enkephaline teilweise oder ganz gehemmt (156, 157). Auch Puromycin ist ein potenter Inhibitor der Enkephalinhydrolyse durch Gehirnhomogenat (158, 159).

Der Einfluß verschiedener Agentien auf die Menge extrahierten enkephalin-ähnlichen Materials aus Hybridzellen wurde getestet (Tab. 14). In beiden Experimenten werden bei Extraktion mit AcOH oder TCA jeweils gleiche Mengen an extrahiertem, enkephalin-ähnlichem immunoreaktivem Material gefunden. Warum bei Zusatz von EGTA, Bacitracin oder HCl, PMSF und Mercaptoethanol nur etwa die Hälfte bzw. noch weniger gefunden wi

Tab. 14. Einfluß der Extraktionsbedingungen auf die Opioidmenge in den Extrakten

Extraktionsmittel	Leu-Enkephalinäquivalente (pmol/mg Protein)	
	Experiment I	Experiment II
1 M AcOH	0.044	0.58
8 % TCA	0.042	0.50
1 M AcOH+0,2 mM EGTA	0.027	-
1 M AcOH 0.02M HCl + 0.1 % Mercaptoethanol + PMSF (3 mg/l)	0.012	-
1 M AcOH + 0.5 mM Bacitracin	-	0.25

Exp. I. Extrakte aus je ca. 1.4 x 10^8 Zellen (P 23, 18 Petrischalen); BB, LH-20

Exp. II. Extrakte aus je ca. 1.3 x 10^8 Zellen (P 19, 14 Petrischalen); BB, LH-20

ist nicht klar. 8 % TCA denaturiert Proteine irreversibel. Enzymatische Proteolyse dürfte deshalb nicht mehr stattfinden. Durch Zusatz von 1 M AcOH zu den Zellen dagegen werden kaum Proteine gefällt, Proteasen könnten unter diesen Bedingungen noch aktiv sein. Da aber gleiche Mengen Opioid wie mit TCA erhalten werden, scheint dies nicht der Fall zu sein. Aus experimentellen Gründen (kein Ausschütteln der TCA mit Ether erforderlich, Mitextraktion eines TCA-sensitiven Proteinfaktors, s. Kapitel IV) wurden, wie schon erwähnt (S. 71), nahezu alle weiteren Extrakte mit 1 M Essigsäure hergestellt. Die spezifische Aktivität der Opioide in beiden Experimenten (Tab. 14) unterscheidet sich um mehr als

eine Größenordnung. Schwankungen dieser Art wurden häufig beobachtet. In Kapitel III. 1. (S. 147) wird näher darauf eingegangen.

II. 2.5. Zusammenfassung

1.) Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen hemmen die durch PGE_1 bedingte Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels. Extrakte aus beiden Zell-Linien interferieren mit der Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Opioidrezeptoren sowie an spezifische Antikörper. Die Ergebnisse aus den drei Tests (cyclo AMP-Test, Bindungstest, RIA) stimmen nicht überein. Reinigung der Extrakte ist deshalb notwendig.

2.) Reinigung der Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen mittels Gelchromatographie an Biogel P 4 liefert verschiedene Fraktionen, die die cyclo AMP-Bildung hemmen können, sowohl in Hybrid- als auch in Gliomazellen. Die Substanzen in den am stärksten hemmenden Fraktionen (98 - 108) von Hybridzellextrakten sind stabil gegen eine Reihe von Proteasen und gruppenspezifischen Reagentien. Behandlung der Fraktionen mit Ninhydrin, Fluorescamin, NaOH und HCl zerstört die Aktivität teilweise oder ganz. Über die chemische Natur der aktiven Komponente(n) kann nichts ausgesagt werden. Opioidaktivität wird in diesen Fraktionen nicht beobachtet.

3.) In denselben Fraktionen (98 - 108), die in Gegenwart von PGE_1 den cyclo AMP-Spiegel absenken, sind Substanzen enthalten, die in Abwesenheit von PGE_1 den cyclo AMP-Spiegel erhöhen. Diese Substanzen sind keine Adeninnucleotide. In einigen Fraktionen (44-48) sind wahrscheinlich aber auch Proteine und mit ziemlicher Sicherheit AcCh enthalten.

4.) Wird ein Extrakt an Biogel P 4 fraktioniert, so hemmen die Fraktionen die cyclo AMP-Bildung unterschiedlich stark. Es entsteht ein Fraktionsmuster. Die Fraktionsmuster von Extrakten aus Hybrid- und Gliomazellen sowie aus FCS, Hybridzelltumoren und Rattengehirn sind sehr ähnlich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die nichtopioiden aktiven Substanzen in den Hybrid- und Gliomazellextrakten aus dem FCS stammen. Gleiches gilt für Tumor- und Gehirnextrakte. Das Blut der Tiere könnte die Quelle der aktiven Komponenten sein.

5.) Unter besonderen Bedingungen kann mittels Gelchromatographie an Biogel P 4 opioidaktives Material aus Hybridzellextrakten abgetrennt werden. Kombination von Adsorptionschromatographie an Polystyrolcopolymeren (Bio-beads) und Verteilungschromatographie am Sephadex LH-20 führt zur Anreicherung von opioidaktiven Komponenten aus Hybridzellextrakten. Die Konzentrationen in den Extrakten, die mit drei verschiedenen Testsystemen (cyclo AMP-Test, Rezeptorbindungstest, RIA) ermittelt werden, stimmen gut überein. Aus dem Vergleich der Aktivität in den drei Test-

systemen, sowie dem chromatographischen Verhalten an BB und Biogel P 4 scheint es sich bei dem opioidaktiven Material um Enkephaline zu handeln. Diese werden am besten mit 1 M AcOH oder 8 % Trichloressigsäure aus den Zellen extrahiert.

II. 3. Studien zur Charakterisierung von Opioidpeptiden aus Hybridzellextrakten

Im vorletzten Kapitel (II. 2.4.) wurde erwähnt, daß es sich bei den Opioiden aus Hybridzellen möglicherweise um Enkephaline handelt. Im Folgenden soll nun die Identität dieser Opioide weiter aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck werden partiell gereinigte Extrakte mit verschiedenen hochauflösenden chromatographischen Verfahren aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen werden auf Aktivität untersucht und mit in gleicher Weise behandeltem synthetischem Met- und Leu-Enkephalin verglichen. Zunächst wird jedoch die Wirkung von Proteasen auf die Hybridzellopioide beschrieben.

II. 3.1. Behandlung von partiell gereinigten Extrakten mit Proteasen

Die in der Einleitung erwähnten endogenen Opioide sind Peptide. Diese können durch Proteasen verdaut werden. Enkephaline verlieren ihre biologische Aktivität nach Behandlung mit Carboxypeptidase A und Leucinaminopeptidase, nicht aber nach Trypsinbehandlung (145). Es gibt aber auch Berichte über morphin-ähnliche, nichtpeptidische Opioide, die aus Rindergehirn (160, 161) und menschlichem Blut (162) stammen.

Um zwischen beiden Gruppen von Opioiden unterscheiden zu können, wurden partiell gereinigte Extrakte mit CPA, LAP und Trypsin behandelt (Tab. 15).

Tab. 15. Einfluß verschiedener Proteasen auf die biologische Wirksamkeit von Hybridzellopioiden

	Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs (%)					
Experiment-Nr.	I	I	I	I	II	II
Zugabe	Kontrolle	CPA	Kontrolle	LAP	Kontrolle	Trypsin
Puffer	11±21	10±11	- 16±11	- 4±10	12±4	6±7
Leu-Enkephalin 12 pmol	78± 6	18±18	82± 4	10± 4	97±1 (8 pmol Leu-Enkephalin)	93±1
enkephalin-ähnliches Material aus Hybriden						
10 µl	42± 8	10± 1	55± 4	- 1± 1	10 µl 63±12	73±1
30 µl	62± 1	2± 6	71± 2	4±11	20 µl 87± 2	85±3

Experiment I 1.7 x 10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 90 %, P 18), maximaler cyclo AMP-Wert: 325 ± 28 pmol/mg Protein.

Experiment II 1.4 x 10^5 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 90 %, P 16), maximaler cyclo AMP-Wert: 1560 ± 190 pmol/mg Protein.

Details der Enzymbehandlung im Experimentellen Teil. Extrakte aus Hybridzellen P 19 (Exp. I) bzw. P 16-18 (Exp. II), partiell gereinigt.

In gleicher Weise wie die beiden Enkephaline wird das enkephalinähnliche Material aus Hybridzellen durch CPA und LAP vollständig inaktiviert. Trypsinbehandlung hat keinen Effekt.

Die Opioide aus Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen sind also Peptide, verschieden von den nichtpeptidischen Opioiden und im Verhalten gegenüber Proteasen wiederum ähnlich den Enkephalinen.

II. 3.2. Reinigung der Extrakte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist derzeit eines der höchstauflösenden Trennverfahren und ist zudem eine sehr schnelle und für viele Substanzklassen verwendbare Methode. Die Reproduzierbarkeit einzelner Trennläufe ist außerordentlich hoch. Die HPLC mit sogenannten "Reversed phase"-Säulen (RP-Säulen) wurde erfolgreich zur Reinigung verschiedenster Peptide eingesetzt. RP-Säulen bestehen aus einer hydrophoben stationären Phase (Kieselgel, das mit C_8 oder C_{18}-Alkylketten belegt ist) und einer hydrophilen mobilen Phase. Als Beispiele derart gereinigter Peptide seien Somatostatin (163), Glucagon und Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) (164) und Thyrotropin-releasing hormone (165) genannt. Auch zur Reinigung und Auftrennung von Opioidpeptidgemischen ist die HPLC geeignet (166-170).

Um zu sehen, welche Opioidpeptide in den Zellextrakten enthalten sind, wurden partiell gereinigte Extrakte an C_{18}-RP-Säulen weiter gereinigt. Dabei wurden die Bedingungen so gewählt, daß Met- und Leu-Enkephalin gut getrennt werden. Die Fraktionen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, den

cyclo AMP-Gehalt in Hybridzellen abzusenken (Abb. 39).

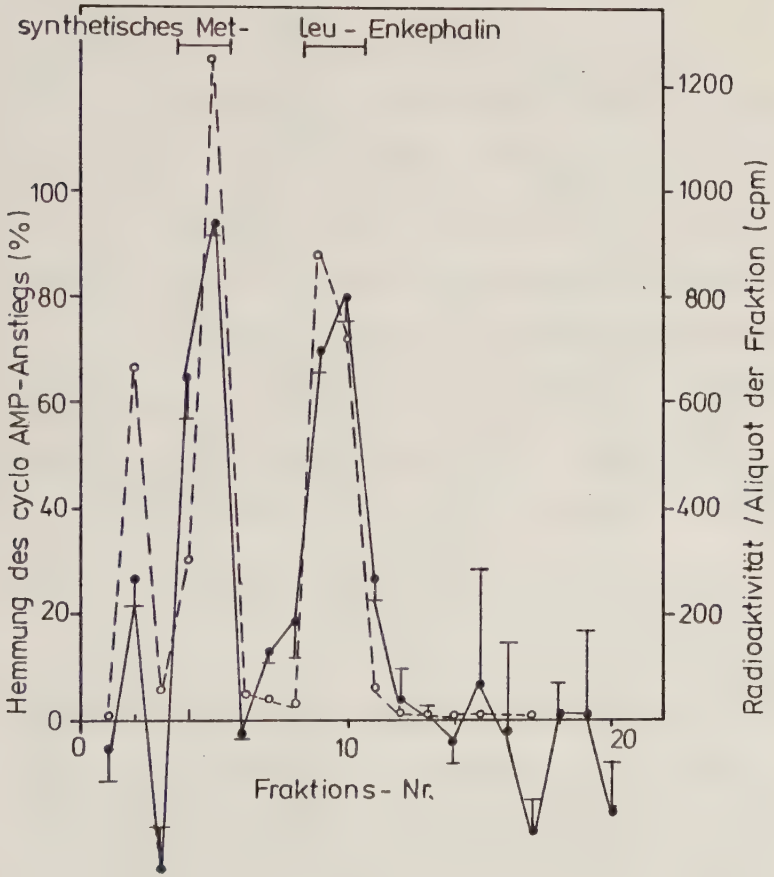


Abb. 39. HPLC von partiell gereinigtem Hybridzellextrakt sowie radioaktivem Met- und Leu-Enkephalin

1.5×10^5 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 95 %, P 14), maximaler cyclo AMP-Wert: 982 ± 63 pmol/mg Protein.
Säule: 10/um RP-18; Flußgeschwindigkeit: 1.5 ml/min
Elutionsmittel: 0.01 M NH_4AcO, pH 4.5, 41% Methanol
Fraktionsvolumen: 3 ml ≙ 2 min; eingeengt auf 100/ul
20/ul davon wurden in den Test eingesetzt, 10/ul für die Radioaktivitätsmessung verwendet.

Biologische Aktivität •——•, Radioaktivität o------o;

Vereinigte Enkephalin-Fraktionen verschiedener Extrakte wurden injiziert.

Die Radioaktivitätsgipfel von ^{3}H-Met- und ^{3}H-Leu-Enkephalin fallen mit den Gipfeln der biologischen Aktivität zusammen. Die Retentionszeiten von radioaktiven Enkephalinen und Opioiden aus Hybridzellen sind identisch mit denen von synthetischem Met- bzw. Leu-Enkephalin. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich bei den Hybridzellopioiden um Enkephaline handelt. Die Radioaktivität und biologische Aktivität in Fraktion 2 (Abb. 39) stammt von während der Aufarbeitung oxidiertem Met-Enkephalin (Met-Enkephalin-sulfoxid oder -sulfon, Met (O)-Enkephalin). Auch mit einem anderen Elutionsmittelgemisch (5 % AcOH, linearer Gradient von 10-40 % Propanol-1 in 20 min, nach Ref. 170), sind die Retentionszeiten für synthetische Enkephaline und extrahierte Opioide gleich (Abb. 40).

Im Ratten-, Kaninchen- und Meerschweinchengehirn ist ca. 3 - 4 mal mehr Met- als Leu-Enkephalin enthalten (63). Im Rindergehirn dagegen ist das Verhältnis gerade umgekehrt (171). Es ist daher interessant, das Mengenverhältnis der beiden Hybridzellopioide festzustellen. Zu diesem Zweck wird eine RP-18-Säule mit synthetischen Enkephalinen geeicht. Im den jeweiligen Enkephalinen entsprechenden Zeitraum nach Injektion des Extraktes wird das Eluat nach Austritt aus der HPLC-Säule gesammelt, anschließend eingeengt und getestet. In Abb. 41 sieht man, daß sowohl die Met-enkephalin-ähnliche, als auch die Leu-enkephalin-ähnliche Fraktion den durch PGE_1 bedingten cyclo AMP-Anstieg konzentrationsabhängig verhindern. In beiden Fällen ist die

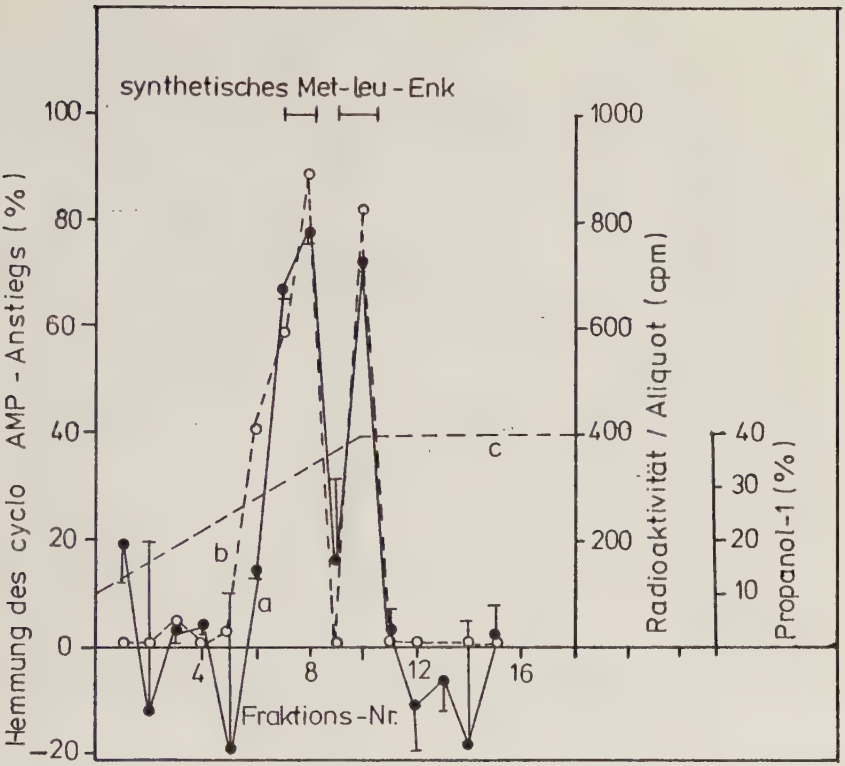


Abb. 40. HPLC von partiell gereinigtem Hybridzellextrakt sowie radioaktivem Met- und Leu-Enkephalin

1.5×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 95 %, P 22); maximaler cyclo AMP-Wert 1670 ± 210 pmol/mg Protein. Säule 10 µm RP-18; Flußgeschwindigkeit 1.0 ml/min. Elutionsmittel: 5 % AcOH mit einem linearen Gradient (Exponent am Gradientmischer m=1) von Propanol-1 von 10 % -40 % (v/v) in 20 min. Fraktionsvolumen 2 ml ≙ 2 min, eingeengt auf 100 µl; 20 µl davon wurden in den Test eingesetzt, 10 µl für die Radioaktivitätsmessung.

Kurve a: biologische Aktivität (•———•); Kurve b: Radioaktivität (o----o), Kurve c: Gradient von Propanol-1 (-------).

Der injizierte Extrakt stammt aus ca. 8×10^7 Hybridzellen (P 16, 14 Petrischalen), die in Gegenwart von 1 µM Dexamethason gezüchtet wurden.

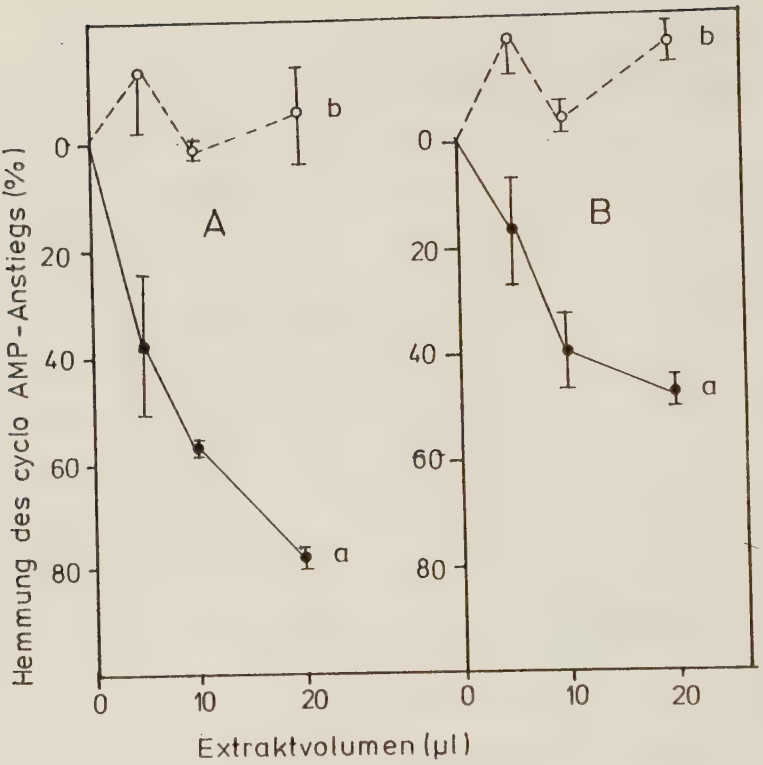


Abb. 41. Bestimmung des Gehalts an Met- und Leu-enkephalin-ähnlichem Material im Extrakt aus Hybridzellen.

2.2×10^5 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 96 %, P 17); maximaler cyclo AMP-Wert 405 ± 45 pmol/mg Protein.
Extrakt (aus ca. 2.1×10^8 Zellen, P 15, 30 Petrischalen), gereinigt über BB, LH-20, HPLC.
Elutionsbedingungen bei der HPLC wie in Legende zu Abb. 39 beschrieben.
Ausbeute an ^{3}H-Met-Enkephalin 25 %, an ^{3}H-Leu-Enkephalin 34 %.

Endvolumen 200 µl.

Fraktionen: A: Met-Enkephalin-Fraktion in Abwesenheit (Kurve a) und Anwesenheit (Kurve b) von 10 µM Naloxon

B: Leu-Enkephalin-Fraktion in Abwesenheit (Kurve a) und Anwesenheit (Kurve b) von 10 µM Naloxon.

Hemmung durch Naloxon vollständig aufhebbar. Aus der Dosis-Wirkungskurve für synthetisches Leu-Enkephalin kann die Konzentration an enkephalin-ähnlichem Material in den beiden Fraktionen bestimmt werden. Met- und Leu-Enkephalin hemmen den cyclo AMP-Anstieg nämlich gleich potent (100). Unter Einberechnung der jeweiligen Ausbeuten ergibt sich für das Verhältnis Met- zu Leu-Enkephalin ein Faktor von 3.3. Dasselbe Verhältnis ergibt sich bei Untersuchung der beiden Fraktionen mit Hilfe des RIA. Der Wert entspricht dem, der für Ratten-, Kaninchen- und Meerschweinchengehirn berichtet wurde (63). Es sei erwähnt, daß die Met- und Leu-enkephalin-ähnlichen Fraktionen nach dem HPLC-Lauf noch nicht vollständig gereinigt sind. Jede Fraktion enthält noch Material, das bei 210 nm starke Extinktion zeigt (bei zweithöchster Empfindlichkeitsstufe des Spektrometers).

I. 3.3. Bestimmung der Opioidaktivität in Extrakten nach Dünnschichtchromatographie

Neben der HPLC ist die Dünnschichtchromatographie (DC) eine weitere hochauflösende, häufig angewandte, schnelle Trennmethode. Enkephaline wurden damit aus Extrakten abgetrennt (145). Diese Methode wurde deshalb für die weitere Reinigung von partiell gereinigten Hybridzellextrakten benutzt. Abb. 42 zeigt die Opioidaktivität der einzelnen von der Dünnschichtplatte gekratzten Fraktionen im cyclo AMP-Test. Fraktionen 3 und 5 hemmen den Anstieg der cyclo AMP-Konzentration stark; ihre Wirkung wird durch Naloxon blockiert. Das Radioaktivitäts-

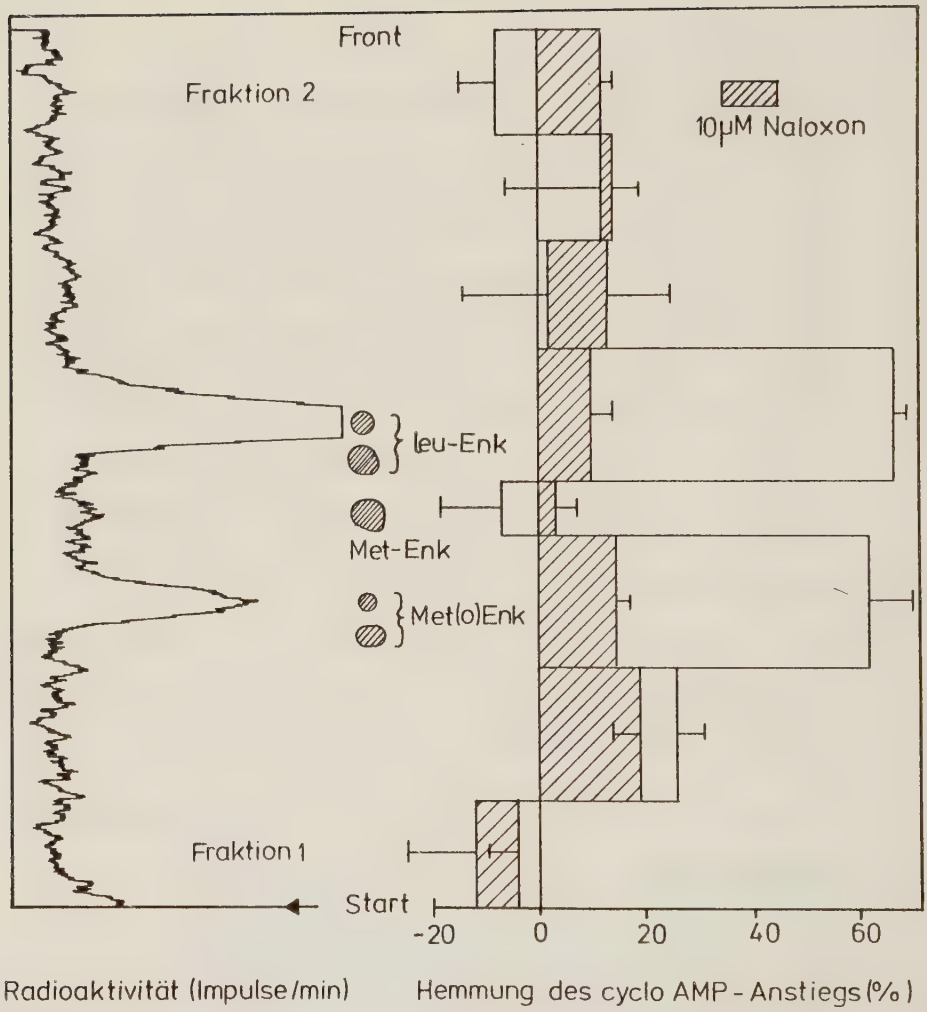


Abb. 42. Dünnschichtchromatographie von Hybridzellextrakt sowie synthetischem und radioaktivem Met(o)- und Leu-Enkephalin.

1.3×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 93 %, P 19); maximaler cyclo AMP-Wert 420 ± 27 pmol/mg Protein
DC-Platte: Kieselgel, 0.25 mm Schichtdicke,
Laufmittel: 1-BuOH: AcOH: H_2O = 60:15:25 (v/v), 4.5 h.

Extrakt (nach BB/LH-20) und Enkephaline wurden mit PAS oxidiert. Der Extrakt stammt aus ca. 2.3×10^8 Zellen (P 22, 30 Petrischalen).

chromatogramm zeigt an den Positionen der Opioidaktivität je einen Gipfel für Met(o)- bzw. Leu-Enkephalin. Im RIA wird ebenfalls in den Fraktionen 3 und 5 starke Opioidaktivität beobachtet. Die in beiden Tests erhaltenen Werte stimmen gut überein. Es ist nicht klar, wodurch die Aktivität in Fraktion 2 bedingt ist. Diese wird aber immer sowohl im cyclo AMP-Test als auch im RIA beobachtet. Um keine Aufsplitterung des Met-enkephalin-ähnlichen Materials in Moleküle verschiedenen Oxidationsgrades zu erhalten, wurde der Extrakt vor der DC mit Perameisensäure oxidiert. Bei der Oxidation beider Enkephaline mit PAS entsteht je ein Nebenprodukt mit jeweils höherem Rf-Wert als der des ursprünglichen Peptids. Vermutlich wurde der Tyrosinrest der Enkephaline oxidiert. Die Oxidation mit PAS hat aber auf die biologische Wirksamkeit der Enkephaline keinen Einfluß. Die dem Extrakt zugesetzten radioaktiven Enkephaline scheinen nach der Oxidation den Nebenprodukten zu entsprechen. Auch in der DC verhalten sich also die Hybridzell-opioide genauso wie die beiden Enkephaline.

I. 3.4. Bestimmung der Opioidaktivität nach Hochspannungspapier-elektrophorese

Die bislang beschriebenen Reinigungsverfahren für die Hybridzellextrakte wie Adsorptions-, Gel- und Verteilungschromatographie, HPLC und DC beruhen auf unterschiedlichen Trennprinzipien, wobei aber die Ladung der Moleküle keine wesentliche Rolle spielt. Diese kann jedoch bei elektrophoretischer Auftrennung ausgenützt werden. Da die Enkephaline abhängig vom pH-Wert nur je eine negative und eine positive Ladung be-

sitzen können, muß die Elektrophorese mit Hochspannung durchgeführt werden. Als Trägermaterial dient Papier. Die Verwendung der Hochspannungspapierelektrophorese (HVPE) zur Reinigung von Enkephalinen ist in der Literatur schon beschrieben (171).

Partiell gereinigte Hybridzellextrakte wurden deshalb mittels HVPE bei pH 3.5 weiter aufgetrennt. Die Fraktionen werden nur im RIA getestet, da bedingt durch Verunreinigungen im Papier und/oder im Elutionsmittel (0.1 M Pyridinacetat, pH 6.4, Pyridin frisch destilliert) sich die Zellen von der Plastikoberfläche der Kulturschalen ablösen. Eine Bestimmung der Opioidaktivität im cyclo AMP-Test ist daher nicht möglich. In Abb. 43 sieht man, daß wiederum die höchste Aktivität in der Met- und Leu-Enkephalin Fraktion gefunden wird. Ein Teil des Met-enkephalin-ähnlichen Materials, sowie des gleichzeitig anwesenden ^{3}H-Met-Enkephalins sind oxidiert (Fraktion 4). Das Radiochromatogramm liefert 3 Gipfel bei Met(o)-, Met- und Leu-Enkephalin an den Stellen hoher Immunreaktivität. So ist auch das Verhalten der Hybridzellopioide im elektrischen Feld identisch dem der beiden Enkephaline. Die Wahrscheinlichkeit, daß die extrahierten Opioide wirklich Met- und Leu-Enkephalin sind, ist damit sehr groß. Met-Enk-Arg^{6}, Leu-Enk-Arg^{6} und Met-Enk-Arg^{6}-Phe^{7} als mögliche andere Opioide laufen wegen ihrer zusätzlichen positiven Ladung in der HVPE wesentlich weiter in Richtung Kathode.

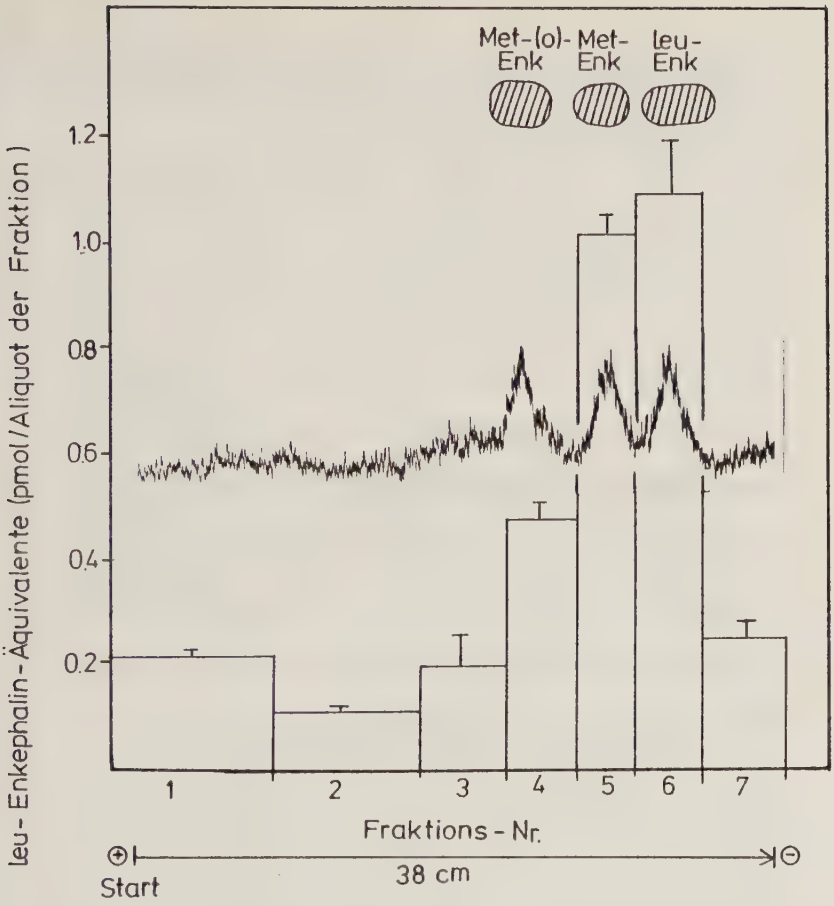


Abb. 43. HVPE von Hybridzellextrakt und synthetischen Enkephalinen.

HVPE bei pH 3.5 , 5000V , 55 mA , 4 h.

Endvolumen der Fraktionen 100 µl. 20 µl wurden in den Test eingesetzt.

Auftrag: Vereinigte Enkephalin-Fraktionen (nach BB/LH-20) verschiedener Extrakte. Dem Extrakt zugesetztes radioaktives Met- und Leu-Enkephalin wurde mittels eines DC-"Scanners" lokalisiert.

II. 3.5. Behandlung des Met- und Leu-enkephalin-ähnlichen Materials aus Hybridzellen mit Bromcyan

Es ist seit langem bekannt, daß BrCN mit Methioninresten in Peptidketten unter Bildung eines Homoserinlactons reagiert (Übersichtsartikel 172). Für die biologische Aktivität der Enkephaline ist die Anwesenheit der C-terminalen Aminosäure unerläßlich (87, 100). Obwohl diese Aminosäure aber durch einige andere ersetzbar und über einen weiten Bereich modifizierbar ist (Übersichtsartikel 173), wird Met-Enkephalin durch BrCN-Behandlung inaktiviert (63). Die Leu-enkephalin-Aktivität dagegen bleibt erhalten. Wenn das Met-enkephalin-ähnliche Peptid aus Hybridzellen durch BrCN-Behandlung inaktiviert wird, nicht dagegen das Leu-enkephalin-ähnliche, so ist das ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich um die beiden Enkephaline handelt. Tab. 16 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Ähnlich wie Met-Enkephalin wird auch die entsprechende HPLC-Fraktion aus Hybridzellen nahezu vollständig inaktiviert. Die Leu-enkephalin-ähnliche Fraktion ist, wie auch synthetisches Leu-Enkephalin, stabil gegen BrCN-Behandlung. Enkephaline und Hybridzellopioide gleichen sich also auch im chemischen Verhalten gegenüber BrCN. Das Verschwinden der Aktivität in Gegenwart von Naloxon zeigt an, daß es sich um Opioide handelt.

Tab. 16. Einfluß von BrCN auf die biologische Wirksamkeit von synthetischen und extrahierten Opioidpeptiden

Zugabe (/uM)	Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs (%)	
	- BrCN	+ BrCN
Puffer (20/ul)	38 ± 9	21 ± 14
Met-Enkephalin (4 pmol)	94 ± 3	25 ± 13
Leu-Enkephalin (4 pmol)	95 ± 5	90 ± 3
Met-Enk-ähnliche Fraktion (20/ul)	94 ± 2	31 ± 3
Leu-Enk-ähnliche Fraktion (20/ul)	78 ± 15	93 ± 7
Met-Enk-ähnliche Fraktion + Naloxon (10)	15 ± 14	11 ± 7
Leu-Enk-ähnliche Fraktion + Naloxon	-5 ± 24	-1 ± 8

1.0×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung. (Lebensfähigkeit 92 %, P 14); maximaler cyclo AMP-Wert 317 ± 55 pmol/mg Protein.

Extrakt (aus ca. 5.5×10^8 Zellen, P 16, 50 Petrischalen) gereinigt über BB, LH-20, HPLC;

Elutionsbedingungen bei der HPLC wie in Legende zu Abb. 39 beschrieben.

Endvolumen 140/ul. In Test eingesetzt: 20/ul. Wegen Details der Behandlung siehe Experimenteller Teil.

II. 3.6. Dansylierung von synthetischen Enkephalinen und Hybridzellopioiden vor und nach Hydrolyse

Dansylchlorid (DnsCl) reagiert mit primären Aminogruppen unter Bildung eines fluoreszierenden Produkts. Aminosäuren können als Dansylderivate nach 2- oder 3-dimensionaler Chromatographie eindeutig identifiziert werden (174). Durch

Verwendung von ^{3}H-Dansylchlorid mit autoradiographischer Detektion kann die Sensitivität der Methode bis in den pmol-Bereich erhöht werden (nmol-Bereich mit "kaltem" DnsCl).(175). Es wurde versucht, synthetisches Met- und Leu-Enkephalin "kalt" zu dansylieren, die enkephalinähnlichen Peptide aus Hybridzellen dagegen mit radioaktivem DnsCl. Wenn letztere mit den Enkephalinen identisch sind, müssen das Fluoreszenzsignal (synthetische Enkephaline "kalt" dansyliert) und ein Fleck im Radioautogramm (Hybridzellopioide "heiß" dansyliert) nach 2-dimensionaler Chromatographie deckungsgleich sein. Gleiches gilt für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure nach Hydrolyse der Dansylderivate sowie für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung nach Totalhydrolyse und anschließender Dansylierung.

Im Gegensatz zu der publizierten Vorschrift (176) der Dansylierung einzelner Aminosäuren in $NaHCO_3$-Lösung, können nicht hydrolysierte Enkephaline nur in aprotischem Lösungsmittel (Dimethylformamid (DMF)) gut umgesetzt werden (nach einem Vorschlag von Prof. L. Moroder, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried). Andernfalls erhält man mehrere Reaktionsprodukte. Abb. 44 zeigt ein Test-Autoradiogramm nach Dansylierung verschiedener Mengen von synthetischem Met- und Leu-Enkephalin. Je 2 pmol dansylierten Met- oder Leu-Enkephalins ergeben nach 2-wöchiger Expositionsdauer einen gut sichtbaren Fleck. Dieser ist deckungsgleich mit dem entsprechenden, gelb fluoreszierenden Fleck der nicht-

radioaktiven Enkephalin-Dansylderivate. Der große, im UV-Licht hellblau fluoreszierende Fleck, wird von hydrolysiertem DnsCl (=DnsOH) hervorgerufen. In den Chromatogrammen 2 - 4 ist über dem ^{3}H-Dansyl-Met-Enkephalin noch der von ^{3}H-Dansyl-Met(o)-Enkephalin zu sehen. Da aus ex-

Abb. 44. Radioautogramm von ^{3}H-Dansylderivaten von Met- und Leu-Enkephalin.

Expositionsdauer 14 Tage

Leu-Enk: 2 pmol (1), Met-Enk: 2 pmol (2), 4 pmol (3) 6 pmol (4).

Pfeile: Position von ^{3}H-Dansyl-Met- bzw. Leu-Enkephalin nach 2-dimensionaler Chromatographie (entsprechend dem Fluoreszenzsignal von Dansyl-Met- bzw. Leu-Enkephlin).

perimentellen Gründen das Volumen der dansyl-enkephalinhaltigen Lösung mindestens 5 μl betragen muß, wovon 1 μl chromatographiert werden kann, müßten also zum sicheren

Nachweis von gereinigtem Met- und Leu-enkephalin-ähnlichem Material aus Hybridzellen je ca. 10 pmol vorhanden sein. Um die Schwärzung des Films durch DnsOH nicht zu stark werden zu lassen, wurde eine maximale Expositionsdauer von 2 Wochen gewählt. Exposition des Films bei -70^{o} C, wie sie sich bei der Verwendung von ^{14}C-Verbindungen und üblichen Röntgenfilmen als günstig erwiesen hat (177), bringt bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Spezialfilm (^{3}H-Ultrofilm der Fa. LKB) nach Aussage des Herstellers keine Verbesserung. Auch ein Besprühen der Chromatogramme mit einer sogenannten Verstärkerlösung bleibt ohne sichtbare Erhöhung der Sensitivität, sowohl bei diesem als auch bei normalem Röntgenfilm.

In einem Experiment wurden Reste von sehr aktiven Leu-enkephalin-ähnlichen Fraktionen verschiedener Hybridzell-Extrakte nach HPLC vereinigt. Nach dem Umzug unseres Labors wurde diese vereinigte Fraktion erneut über HPLC gereinigt und die Hälfte davon dansyliert. Entsprechend Abb. 45 A wird in der Fraktion mit der Retentionszeit von Leu-Enkephalin im Autoradiogramm ein Fleck gefunden, der mit synthetischem Dansyl-Leu-Enkephalin deckungsgleich ist. Die Met-Enkephalin-Fraktionen waren vor dem Umzug für andere Versuche verbraucht worden. Wodurch die starke Schwärzung links oben verursacht ist, ist unklar. Sie wird aber häufig beobachtet.

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure wird das restliche dansylierte Leu-enkephalin-ähnliche Material hydro-

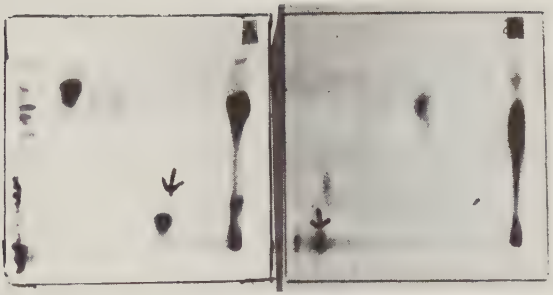


Abb. 45. Radioautogramm von ^{3}H-Dansylderivaten der Leu-Enkephalin-Fraktion aus Hybridzellextrakten vor (A) und nach (B) Hydrolyse. Pfeile: Positionen von fluoreszierendem Dansyl-Leu-Enkephalin (A) bzw. Dansyl-Tyrosin (B). Expositionsdauer 14 Tage.

lysiert (6 M HCl, 105° C, 16 h) und erneut chromatographiert. Nur die N-terminale Aminosäure ist jetzt noch dansyliert. Diese ist bei Met- und Leu-Enkephalin Tyrosin. Deshalb sollte - bei der angenommenen Gleichheit der Hybridzellopioide mit den beiden Enkephalinen - Dansyl-Tyrosin zu beobachten sein. Abb. 45 B zeigt, daß dies der Fall ist. Nur Dansyl-Tyrosin ergibt die am unteren linken Bildrand zu sehenden zwei Flecken. Diese stimmen mit dem Fluoreszenzsignal überein, das von authentischem Dansyl-Tyrosin stammt. Da Tyrosin sowohl an der Aminogruppe als auch an der Hydroxlgruppe dansyliert wird, entstehen mehrere Reaktionsprodukte.

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung wird die andere Hälfte der Leu-enkephalin-ähnlichen Fraktion einer Totalhydrolyse unterworfen, anschließend dansyliert und mit Standard-

dansylaminosäuren chromatographiert. Abb. 46 zeigt, daß die im Leu-Enkephalin enthaltenen Aminosäuren Tyrosin, Glycin, Phenylalanin und Leucin im Hydrolysat vorhanden sind. Ob die Flecken links neben dem Leu-Fleck und darüber von Ile, Val und Pro stammen, ist nicht klar. Wahrscheinlich sind noch Verunreinigungen in der Leu-Enkephalin Fraktion enthalten. Es ist ferner nicht geklärt, warum der Glycin-Fleck so schwach zu sehen ist, obwohl 2 Moleküle davon im Enkephalin enthalten sind.

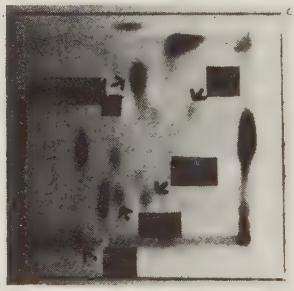


Abb. 46. Radioautogramm von ^{3}H-Dansylaminosäuren nach Totalhydrolyse von Leu-enkephalin-ähnlichem Material aus Hybridzellen.
Expositionsdauer 14 Tage.
Pfeile: Positionen der fluoreszierenden Dansylaminosäuren.

Nach dem eben beschriebenen Experiment ist die Existenz von Leu-Enkephalin in den Hybridzellextrakten höchst wahrscheinlich. Es ist allerdings nicht gelungen, dieses Ergebnis in gleicher Weise zu reproduzieren und außerdem eindeutig die Anwesenheit von Met-Enkephalin in den Extrakten zu zeigen.

Zwei Gründe mögen dafür verantwortlich sein: a) Wie in Kapitel III. 1.1. (S. 147) gezeigt werden wird, schwanken die in den Hybridzellen enthaltenen Mengen an enkephalin-ähnlichen Peptiden über einen weiten Bereich von Experiment zu Experiment (bis Faktor 100). Die Gründe hierfür sind noch nicht bekannt. Nach dem Umzug des Labors nach Würzburg waren die Schwankungen zwar geringer, die Absolutmengen dafür aber ebenfalls sehr gering. Der Nachweis der Enkephaline in Hybridzellextrakten ist dadurch erschwert. In einigen Versuchen wurden im Radioautogramm daher keine spezifischen Enkephalinflecken beobachtet. Wegen der geringen Mengen an Opioiden können diese während der Reinigungsphase auch nicht getestet werden, so daß die gesamte Reinigungsprozedur "blind" durchgeführt werden muß. b) Um trotzdem einen definierten Strukturbeweis für die enkephalin-ähnlichen Peptide führen zu können, mußten trotz hormoneller Erhöhung des Gehalts an enkephalin-ähnlichem Material (s. Kapitel III. 2.2. S. 159) wesentlich größere Mengen an Zellen extrahiert werden. Die Reinigung solcher Extrakte führte bei Verwendung der bisher benutzten Methoden aber zu erheblichen Schwierigkeiten. Es mußten deshalb andere Reinigungsverfahren wie HVPE und DC angewendet werden. Dadurch wurden aber neue Verunreinigungen eingeschleppt. In Abb. 47 ist das Ergebnis eines solchen Versuches zu sehen. Der Extrakt (aus ca. 3.2×10^9 Hybridzellen, P 16 - 19, 410 Petrischalen) war über folgende Stufen gereinigt worden: BB, LH-20, HVPE, HPLC, DC, 2 x HPLC (mit Elutionssystem 2,

s. unten). Die Ausbeute an ^{3}H-Met- und-Leu-Enkephalin betrug je drei Prozent.

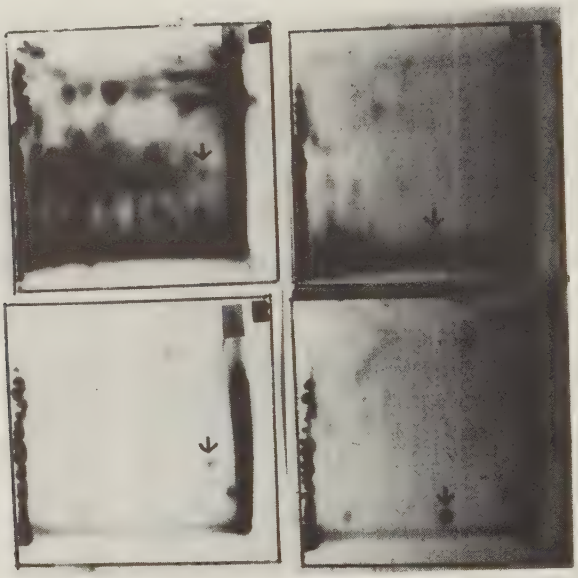


Abb. 47. Radioautogramm von ^{3}H-Dansylderivaten von aus Hybridzellen isolierten (1,2) und synthetischen (3,4) Enkephalinen.

1: Met(o)-Enkephalin-Fraktion; 2: Leu-Enkephalin-Fraktion; 3: Met(o)-Enkephalin (2pmol); 4: Leu-Enkephalin (2 pmol).

Expositionsdauer: 14 Tage.
Pfeile: Positionen der entsprechenden fluoreszierenden Dansyl-Enkephalin-Flecke.

An den Stellen, wo Dansyl-Met(o)-Enkephalin (1) bzw. Dansyl-Leu-Enkephalin (2) sich befinden sollen, ist jeweils ein schwacher Fleck zu sehen, der völlig deckungsgleich mit dem Fluoreszenzsignal von gleichzeitig aufgetragenem Dansyl-

Met(o)- bzw.-Leu-Enkephalin ist. Das kann als Hinweis auf die Anwesenheit von Enkephalinen in den Extrakten gewertet werden. Diese beiden Flecke werden nicht durch das noch in den Extrakten enthaltene radioaktive Met(o)- bzw. Leu-Enkephalin hervorgerufen. Kontrollinkubationen mit den entsprechenden Mengen radioaktiver Enkephaline ergeben keine sichtbaren Flecke. In beiden Fraktionen, besonders der Met(o)-Fraktion, sind aber noch etliche Verunreinigungen enthalten. Synthetisches Met(o)- bzw. Leu-Enkephalin (3 bzw. 4) sind als positive Kontrolle dansyliert worden. Wegen des enormen finanziellen (für die Züchtung großer Zellmengen) und zeitlichen (Zellzüchtung und Reinigung der Extrakte) Aufwandes konnte ein ähnliches Experiment, wie eben beschrieben, mit verbesserten Reinigungsbedingungen nicht wiederholt werden. Auf Grund der gemachten Erfahrungen sei für eine weitere Isolierung folgendes Reinigungsschema empfohlen: Extrakt (TCA) → BB → LH-20 → Oxidation mit PAS → HVPE → DC → HPLC (System 1) → HPLC (System 2). (System 1: 0.01 M NH_4AcO, pH 4.5, 41 % Methanol. System 2: 5 % AcOH, Propanol-1, 10 - 40 % in 30 min. konkaver Gradient, Einstellung am Gradientenmischer: Exponent m=3). Auf Grund der Verunreinigungen in den beiden Fraktionen (Met(o)- bzw. Leu-Enkephalin) erschien eine Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren nicht sinnvoll.

Auf Grund der bisher gezeigten Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, daß die beiden Opioidpeptide aus Hybridzellen Met- und Leu-Enkephalin sind. Die Hybridzell-Linie 108CC15

ist damit die erste Zell-Linie, von der die Produktion enkephalin-ähnlicher Substanzen bekannt ist.

II. 3.7. Versuche zur Lokalisation von Enkephalinen in Hybridzellen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die hohe Spezifität von Antikörpern für ihr Antigen kann zur Lokalisation des Antigens benutzt werden. Als besonders günstig hat sich die indirekte Immunfluoreszenzmethode erwiesen (178), sowie die von L. Sternberger entwickelte Peroxidase-anti-Peroxidase-(PAP)-Methode (Übersichtsartikel Ref. 179). Beide Methoden wurden zur Lokalisation von Met- und Leu-Enkephalin in verschiedenen Geweben mehrerer Species angewandt (Übersichtsartikel 180). In Primärkulturen von fötalem Rattengehirn (181) und in Neuroblastoma-Zellen N1E-115 (182) werden mittels der Immunfluoreszenztechnik Enkephalin-haltige Zellen gefunden. Allerdings wird bei den Primärkulturen nur in 2 % der Neuronen und nur in 10 % der Neuroblastomazellen eine positive Reaktion beobachtet. Über die Spezifität der Effekte und die biochemische Charakterisierung der Antigene wird aber nichts berichtet. Es wurde versucht, die enkephalin-ähnlichen Peptide in den Hybridzellen zunächst mittels Immunfluoreszenz sowohl an fixierten Zellen als auch an Kryostatschnitten nachzuweisen. Bei Verwendung von auf Deckgläschen haftenden Zellen wird bei verschiedenen Verdünnungen sowohl des Präimmunserums wie auch des spezifischen Antiserums eine, in beiden Fällen gleiche, starke Hintergrundfluoreszenz beobachtet (Verdünnungen 1:10 , 1:30, 1:50, 1:90). Präadsorption von Prä-

immun- und Antiserum an Hybridzellen (nach einem Vorschlag von K. Hallermayer) hat keine Verbesserung zur Folge. Um die unspezifische Adsorption von Präimmun- und Antiserum an die Zelloberfläche zu erniedrigen, wurden von fixierten Hybridzellen Kryostatschnitte angefertigt und für die Immunfluoreszenz benützt. Ab einer Verdünnung der Seren von 1:20 wird keine Hintergrundfluoreszenz mehr beobachtet. Doch wird weder nach Fixation der Zellen mit 1 %- oder 4 %-igem Paraformaldehyd noch nach Waschen der fixierten Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) oder einer konzentrierten Zuckerlösung eine spezifische Fluoreszenz gefunden. Fixation der Zellen in isotonischer, 1 %-iger Formaldehyd-Lösung sowie Auswaschen mit Zuckerlösung führt zu einer besseren Zellstrukturerhaltung (Kugler, Anatom. Institut, Würzburg, persönliche Mitteilung). Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten für dieses negative Ergebnis: a) Die Sensitivität der Methode ist zu gering, um so kleine Mengen von Met- und Leu-Enkephalin zu entdecken. b) Die Fixation der Enkephalinmoleküle ist ungenügend, so daß diese später ausgewaschen werden. c) Fixiertes Met- oder Leu-Enkephalin werden von den Antikörpern nicht mehr oder nurmehr schlecht gebunden. d) Das verwendete Antiserum ist für die Immunfluoreszenztechnik nicht geeignet. Es wurden noch keine weiteren Versuche zur Klärung des Problems unternommen.

Stattdessen soll in noch auszuführenden Experimenten versucht werden, mit Hilfe der PAP-technik die Anwesenheit von Enkephalinen in Hybridzellen nachzuweisen. Diese Methode ist

ca. 100 - 1000 mal sensitiver als die Immunfluoreszenzmethode. Bei der PAP-Methode wird über einen Zwischenantikörper (z. B. Ziegen-Anti-Kaninchen-Antiserum) der primäre Anti-Enkephalin-Antikörper (aus Kaninchen) mit dem Anti-Peroxidase-Antikörper (ebenfalls aus Kaninchen) verbunden. In dem Peroxidase-anti-Peroxidase-Antikörperkomplex sind 3 Moleküle Peroxidase enthalten. Dadurch wird in der enzymatischen Reaktion aus Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid viel polymerer Farbstoff gebildet. Die Sensitivität ist deshalb erhöht.

II. 3.8. Einbau von radioaktivem Methionin und Leucin in Hybridzellen

Wenn Met- und Leu-Enkephalin in Hybridzellen synthetisiert werden, müßte Inkubation der Zellen mit radioaktivem Methionin oder Leucin zur Bildung von radioaktiven Enkephalinen führen. Der Einbau von ^{3}H-Tyrosin (183, 184), von ^{3}H-Tyrosin, ^{3}H-Leucin oder ^{35}S-Methionin (148, 185) in Met- bzw. Leu-Enkephalin wurde beschrieben. Die de novo gebildeten radioaktiven Enkephaline wurden dabei durch DC oder HPLC identifiziert.

Hybridzellen wurden zunächst für 1 Stunde mit serumfreiem Medium inkubiert, das anstelle von Leucin und Methionin ^{3}H-Leucin und ^{35}S-Methionin enthielt. Der Extrakt wurde vorgereinigt und anschließend mittels HPLC fraktioniert. Abb. 48 zeigt die in den Fraktionen enthaltene Radioaktivität, die von ^{35}S-Methionin stammt. Unter den benutzten Zählbedingungen für Doppelmarkierung werden keine Tritiumimpulse im ^{35}S-Schwefel-Kanal gezählt. Dagegen werden umgekehrt ca. 2,5 mal

soviele ^{35}S-Methionin-Impulse im Tritiumkanal wie im Schwefelkanal gemessen. Wenn die im Tritiumkanal gemessene Radioaktivität entsprechend korrigiert wird, sieht man, daß ^{3}H-Leucin keinen Beitrag liefert. Man erkennt, daß in der Met-Enkephalin-

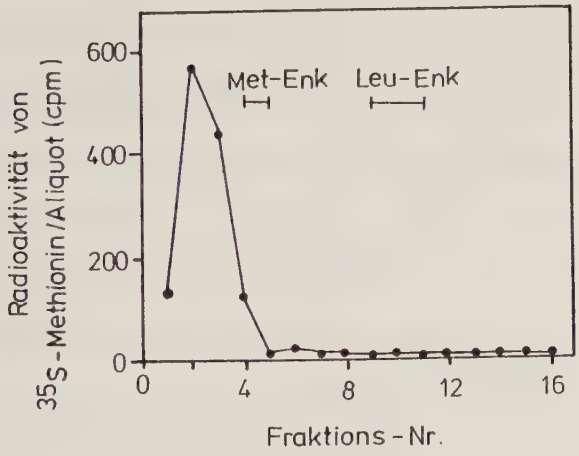


Abb. 48. HPLC-Fraktionierung eines Hybridzellextraktes nach Einbau von ^{35}S-Methionin und ^{3}H-Leucin

$3 \times 3.4 \times 10^{6}$ Hybridzellen (P 17) wurden mit je 24 µCi ^{3}H-Leucin + 40 µCi ^{35}S-Methionin 1 h inkubiert.
Extrakt gereinigt über BB, LH-20, HPLC, Endvolumen 100 µl. 50 µl wurden für die Radioaktivitätsmessung verwendet. Säule und Elutionsbedingungen wie in Legende zu Abb. 39 beschrieben. Zählausbeute für ^{35}S-Methionin: 13 %.

Fraktion (5) kein Radioaktivitätsgipfel vorhanden ist. Auch im Tritiumkanal wird er nicht beobachtet. Gleiches gilt für einen Zellextrakt, der mit Dexamethason (s. Kap. III. 2.2., S. 159) vorbehandelt war. 1-stündige Inkubation mit radio-

aktiven Aminosäuren, sowie anschließende 90-minütige Inkubation mit Methionin und Leucin in den normalen Konzentrationen (pulse-chase-experiment) ändert ebenfalls nichts am Fraktionsmuster. Wenn weniger als 0.5 % des Met-Enkephalin-ähnlichen Peptides in Hybridzellen radioaktives Methionin enthalten, würde das letztlich nicht gemessen werden können. Möglicherweise sind längere Einbauzeiten nötig, da über die Synthese- und Umwandlungsgeschwindigkeit potentieller Vorläufermoleküle nichts bekannt ist. In einem Vorversuch wurde bei 6-stündiger Inkubation mit ^{35}S-Methionin und ^{3}H-Leucin in der Met-Enkephalinfraktion ein radioaktiver Gipfel gefunden. Es ist aber noch nicht geklärt, ob es sich dabei um ^{35}S-Met-Enkephalin handelt.

II. 4. Studien zum Opioidgehalt in verschiedenen Zell-Linien sowie fötalem Kälberserum

Opioidpeptide einschließlich Met- und Leu-Enkephalin kommen im Zentral- und peripheren Nervensystem nur in Neuronen vor. Glia-Zellen, die ca. 50 % der Hirnmasse ausmachen, enthalten keine Opioide.

Die Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen haben Glioma- und Neuroblastoma-Zellen als "Eltern". Die Glia-Eigenschaften sind im Gegensatz zu den neuronalen Eigenschaften nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt. Um zu sehen, ob das Vorkommen von Opioidpeptiden in Hybridzellen für diese spezifisch ist oder auch andere neuronale und nicht neuronale Zellen Opioide synthetisieren, wurden verschiedene Zell-Linien daraufhin untersucht (Tab. 17). Außerdem ist es interessant zu wissen, ob

Tab. 17. Gehalt an enkephalin-ähnlichen Opioiden in verschiedenen Zell-Linien

Zell-Linie	Charakter der Zell-Linie	Leu-Enkephalin-Äquivalente im RIA (pmol/mg) Exp. I	Exp. II	Opioideffekt im cyclo AMP-Test
108CC5	Neuroblastoma x Glioma-Hybrid	0.26	0.40	+
NH15-CA2	(Neuroblastoma x Glioma) x Neuroblastoma-Hybrid-Hybrid	0.40	0.08	+
N18TG2	Neuroblastoma	0.04	0.03	nicht bestimmt
NS20Y	Neuroblastoma	0.03	-	+
C6-BU-1	Glioma	variable Mengen (0 - 0.2)		+/-
C6-4-2	Polyploide Glioma	0.10	0.12	+
B 82	Fibroblast	nicht nachweisbar		-

Alle Extrakte sind partiell gereinigt.

und gegebenenfalls in welchen Mengen enkephalin-ähnliche Opioide in den Elternzellen der Hybride vorkommen. Außer in den B 82-Fibroblasten wird in allen getesteten Zell-Linien Opioidaktivität gefunden. In den beiden untersuchten Neuroblastoma-Linien ist allerdings sehr wenig Aktivität vorhanden. In einer zweiten Hybrid-Zell-Linie, 108CC5, wird dagegen mindestens doppelt soviel enkephalin-ähnliches Material gemessen als in den 108CC15-Zellen. Ähnliches gilt für die cholinergen-adrenergen Hybrid-Hybride NH15-CA2 (186); allerdings schwanken hier, wie auch bei den 108CC15-Zellen festgestellt (s. Kap. III. 1.1., S. 147), die Werte sehr. Überraschenderweise wird

auch in Gliomazellen eindeutige Opioidaktivität beobachtet. In sieben voneinander unabhängigen Experimenten mit C6-BU-1-Zellen wurde in drei Fällen eindeutige Opioidaktivität sowohl im RIA als auch im cyclo AMP-Test nachgewiesen. Zwei Versuche mit C6 -Wildtypzellen ergaben keine eindeutigen Ergebnisse, da sich die gemessenen Werte an der Sensitivitätsgrenze des Tests befanden. Die Zelldichte pro Kulturschale war in allen Fällen etwa gleich. Die Ursache für die Schwankungen ist derzeit völlig unklar. Im Kapitel III. 1.1., S. 147 wird davon noch die Rede sein. In den polyploiden Gliomazellen C6-4 -2 (187, 188) wurde in allen drei Extrakten Opioidaktivität gemessen. Die Menge an Opioiden entspricht der der Hybridzellen 108CC15. Werden C6-4-2-Gliomazellen 2 Tage mit serumfreiem Wachstumsmedium kultiviert und wird dieses Medium (sogenanntes konditioniertes Medium) auf den Opioidgehalt überprüft, so sind 0.1 pmol Leu-Enkephalin-Äquivalente pro Milliliter enthalten. Diese Zellen scheiden also Opioide auch ins Wachstumsmedium aus. Es ist möglich, daß die Produktion enkephalin-ähnlichen Materials in Gliomazellen eine Folge der Transformation dieser Zellen ist. Es ist bekannt, daß in Tumorzellen häufig Eigenschaften exprimiert sind, die in den untransformierten Zellen nicht vorhanden sind. Viele von Tumoren abstammende Zell-Linien produzieren Hormone, die in den normalen Zellen des betreffenden Gewebes nicht vorkommen. Als Beispiel sei die Vasopressin synthetisierende Zell-Linie aus einem Lungencarcinom genannt (189). In einem Vorversuch wurde in konditioniertem Medium (3 Tage) von Pri-

märkulturen aus Gehirnen neugeborener Mäuse, die vorwiegend Astroblasten enthalten (190), keinerlei Opioidaktivität gefunden.

Die Hybridzellen synthetisieren mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlicheit Met- und Leu-Enkephalin. Es ist deshalb interessant zu wissen, ob auch in den anderen, Opioide enthaltende Zellen Met- und Leu-enkephalin-ähnliches Material existiert. Entsprechende HPLC-Fraktionen von Extrakten wurden deshalb im cyclo AMP-Test auf Opioidaktivität untersucht (Abb. 49). Die Hybridzellen 108CC5 zeigen eindeutig Met-Enkephalin-, aber kaum Leu-Enkephalin-Aktivität (A, B) in diesem Experiment. Die Gesamtmenge beträgt (gemessen mittels des RIA) 0.19 pmol/mg Protein und ist damit etwas niedriger als die in Tab. 17 genannten Werte. Nach Behandlung mit Dexamethason (s. Kap. III. 2.2., S. 159) steigen aber Met- und Leu-Enkephalin-Aktivität an. Es sind also wie in den Schwesterzellen 108CC15 beide Aktivitäten vorhanden. Das Verhältnis Met- : Leu-Enkephalin beträgt 3.8 : 1.

In den Extrakten von C6-BU-1- und C6-4-2-Gliomazellen wird ebenfalls Met- und Leu-enkephalin-ähnliche Aktivität gefunden (C-F). Die Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs durch die einzelnen Fraktionen ist zwar klein, aber signifikant. Sie wird außerdem in jedem Falle zumindestens teilweise durch Naloxon aufgehoben. Die Verhältnisse Met- : Leu-Enkephalin sind wegen der Anwesenheit anderer hemmender Substanzen nicht genau anzugeben. Gliomazellen in Kultur scheinen also in der

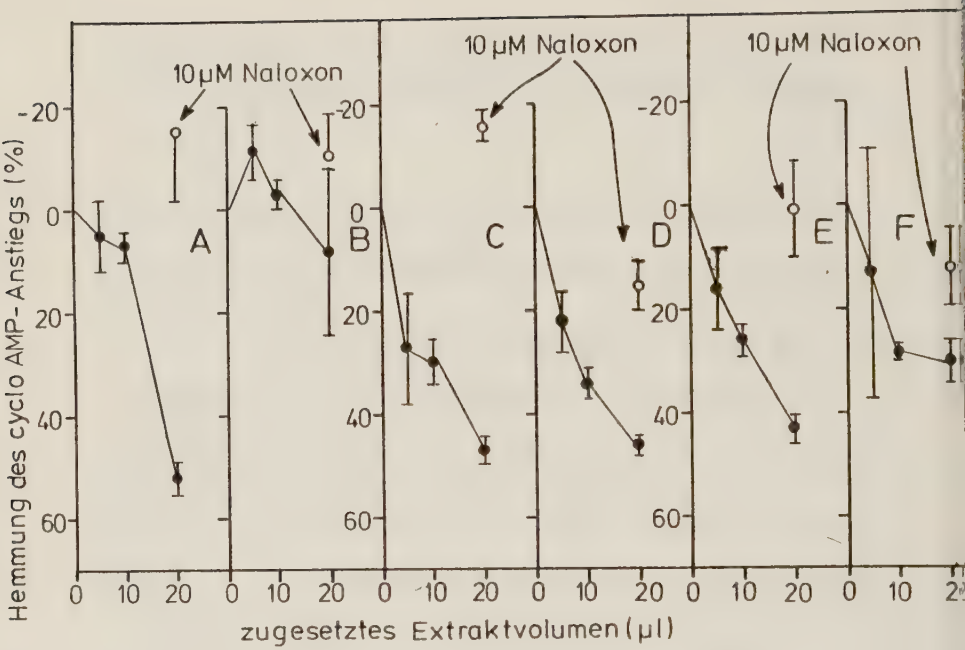


Abb. 49. Bestimmung des Gehalts an Met- und Leu-Enkephalin-ähnlichem Material in Extrakten verschiedener Zellen.

Extrakte aus / mg Zellprotein, P / Anzahl der Petrischalen:

108CC5 / 242 mg, P 17/26: A: Met-Enk- B: Leu-Enk-Fraktion

C6-BU-1 / 509, P 28/45: C: Met-Enk- D: Leu-Enk-Fraktion

C6-4-2/307, P 23/32: E: Met-Enk- F: Leu-Enk-Fraktion

Extrakte sind über BB/LH-20/HPLC gereinigt.

Endvolumen 200 µl (A/B) bzw. 160 µl (C-F).

A, B: 1.7×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung, (Lebensfähigkeit 95 %, P 19), maximaler cyclo AMP-Wert: 692 ± 30 pmol/mg Protein.

C-F: 1.4×10^5 lebende Hybridzellen (Lebensfähigkeit 93 %, P 19), maximaler cyclo AMP-Wert: 420 ± 27 pmol/mg Protein..

Lage zu sein, Met- und Leu-enkephalin-ähnliches Material synthetisieren zu können,was bislang als eine rein neuronale Eigenschaft galt. Es ist in der Literatur berichtet, daß C6-Wildtypzellen ebenso wie Neuroblastomazellen VIP synthetisieren (191). Dieses Peptid wird in vivo ausschließlich in Neuronen des ZNS und des peripheren Nervensystems gefunden. In Zusammenarbeit mit J. Besson und G. Rosselin konnten wir in unseren C6-Wildtypzellen dagegen kein VIP nachweisen, wohl aber in den Hybridzellen 108CC15. Eventuell haben die Unterschiede in den Kulturbedingungen von Labor zu Labor einen großen Einfluß darauf, ob oder in welchem Ausmaß bestimmte Eigenschaften der Zellen exprimiert werden. Daß neuronale Peptide (VIP, Enkephaline) in Gliomazellen vorkommen, mag wie erwähnt, eine Folge der Transformation sein.

Zellen in Kultur müssen meist in Gegenwart von Serum kultiviert werden. Häufig wird dazu FCS verwendet. Falls im Serum Opioide enthalten sind, könnten diese theoretisch von den Zellen aufgenommen werden. Bislang ist aber weder ein direkter noch ein Rezeptor-mediierter Aufnahmemechanismus für irgendwelche Opioide in Zellen beschrieben worden. ß-Endorphin wird von der Hypophyse in signifikanten Mengen ins Blut abgegeben (66-69). Enkephaline werden im Gegensatz zu ß-Endorphin im menschlichen Serum rasch durch Spaltung der Tyrosin-Glycin-Peptidbindung inaktiviert (65). Auch durch FCS wird Met- bzw. Leu-Enkephalin gespalten (Abb. 50). Inkubation von ^{3}H-Met- bzw. ^{3}H-Leu-Enkephalin mit FCS liefert in beiden Fällen ein

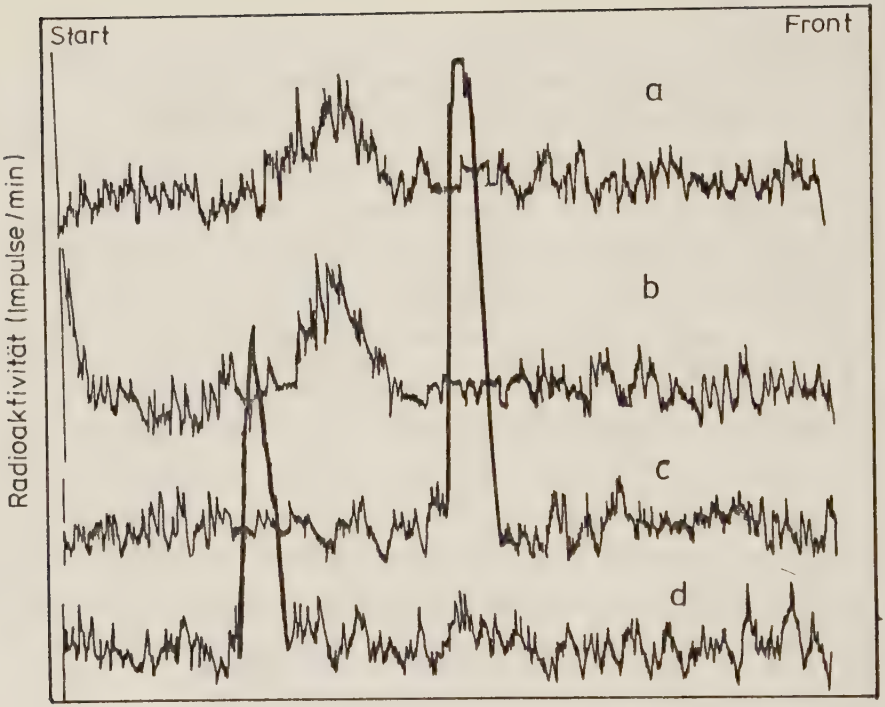


Abb. 50. Dünnschichtchromatographie von ^{3}H-Met- und ^{3}H-Leu-Enkephalin mit und ohne FCS-Behandlung
^{3}H-Leu-Enkephalin mit (a) und ohne (c) FCS-Behandlung
^{3}H-Met(o)-Enkephalin mit (b) und ohne (d) FCS-Behandlung
Je 3.3 x 10^{6} dpm ^{3}H-Met- bzw. Leu-Enkephalin + je 10 pmol "kaltes" Met- bzw. Leu-Enkephalin wurden 60 min bei 37° C mit 1 ml FCS inkubiert.(Radio-Chromatogramme a,b). Die Inkubation wurde durch Zugabe von 0.5 ml kaltes 20% TCA beendet. Bei den Kontrollen (Chromatogramme c,d) wurde nach Zugabe von FCS in der Kälte sofort TCA hinzugefügt.

Produkt, das in der DC ähnlich wie Tyrosin oder Tyr-Gly-Gly-Phe läuft. Mit dem benützten Laufmittel werden beide Substanzen nur sehr schlecht getrennt. Der breite Gipfel des Spaltprodukts überdeckt beide. Möglicherweise entstehen beide Spalt-

produkte durch die Anwesenheit einer Carboxypeptidase und einer Aminopeptidase. Das Enkephalinbruchstück Tyr-Gly-Gly-Phe zeigt aber keine Opioidaktivität mehr (87, 100). Dem entgegengesetzt wird berichtet, daß in menschlichem Plasma Met-Enkephalin vorhanden ist (64). Um zu sehen, ob im FCS enkephalinähnliche Opioide enthalten sind, wurden aus 100 bzw 200 ml FCS mit TCA die Proteine ausgefällt und der Überstand wie üblich über BB und LH-20 gereinigt. Die ^{3}H-Leu-Enkephalinhaltige Fraktion zeigt im RIA starke Kreuzreaktivität (Tab. 18).

Tab. 18. Aktivität von partiell gereinigten Extrakten aus FCS im RIA und im cyclo AMP-Test

Experiment	Enkephalin-Äquivalente im RIA (pmol/ml)	Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs (%)	
		- Naloxon	+ 10 µM Naloxon
I (200 ml FCS, Chargen-Nr. K 189 201 S)	0.52	nicht bestimmt	
II (100ml FCS, Chargen-Nr. T 095 001 S)	0.77	- 18 ± 21	5 ± 23
III (200 ml FCS, Chargen-Nr. L 87 2801 D)	0.16	36 ± 16	40 ± 9

Exp. II. 1.0×10^{5} lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 83 %, P 20), maximaler cyclo AMP-Wert 1425 ± 6 pmol/mg Protein.

Exp. III. 2.4×10^{5} lebende Hybridzellen (Lebensfähigkeit 97 %, P 13), maximaler cyclo AMP-Wert 1151 ± 126 pmol/mg Protein.

Endvolumen 200 µl; 20 µl im cyclo AMP-Test eingesetzt.

Die Unterschiede in den Werten sind eventuell durch die Verwendung von Seren aus verschiedenen Chargen bedingt. Wenn die im RIA gemessenen Enkephalinäquivalente wirklich von Enkephalinen im Serum herrühren, müßten die entsprechenden Fraktionen den durch PGE_1 bedingten Anstieg des cyclo AMP-Spiegels stark hemmen und diese Hemmung müßte durch Naloxon wieder aufgehoben werden. Beides ist nicht der Fall. Die Kreuzreaktivität der Serumfraktionen mit dem Anti-Enkephalin-Antiserum muß deshalb durch etwas anderes bedingt sein. Die mit dem RIA erhaltenen Mengen an Opioiden in Hybridzellextrakten korrelieren mit den im cyclo AMP-Test gemessenen Werten. Enkephaline sind als kleine Moleküle dialysierbar. Trotzdem findet man bei Verwendung von dialysiertem FCS als Mediumzusatz in den Hybridzellen genauso viel Opioidaktivität wie mit nicht-dialysiertem FCS (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der Experimente kann deshalb ausgeschlossen werden, daß die Hybridzellopioide aus dem Serum stammen. Aus dem Vergleich der Meßdaten aus RIA und cyclo AMP-Test mit FCS wird die Notwendigkeit deutlich, zwei voneinander unabhängige Meßprinzipien anzuwenden, um nicht zu falschen Schlüssen zu gelangen.

II. 5. Zusammenfassung

1.) In partiell gereinigten Extrakten aus Hybridzellen kann opioidaktives Material nachgewiesen werden, das dem chromatographischen Verhalten nach enkephalin-ähnlich ist. Durch Behandlung des Extraktes mit CPA oder LAP wird die Aktivität zerstört, nicht dagegen durch Trypsin. Dieses Verhalten gegenüber Proteasen ist identisch dem der Enkephaline.

2.) Bei der Reinigung eines Extraktes mittels HPLC werden zwei aktive Fraktionen erhalten, die dieselben Retentionszeiten wie Met- und Leu-Enkephalin besitzen. Die Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs durch diese zwei Fraktionen wird durch Naloxon aufgehoben. Wie in einigen anderen Spezies beträgt das Verhältnis Met- zu Leu-Enkephalin 3 - 4 : 1. Das Met-enkephalin-ähnliche Material wird durch Behandlung mit BrCN inaktiviert, nicht dagegen das Leu-enkephalin-ähnliche. Auch diese Eigenschaft ist den Hybridzell-Opioiden mit den Enkephalinen gemeinsam.

3.) Werden Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie oder Hochspannungspapierelektrophorese gereinigt, werden in beiden Fällen opioidaktive Fraktionen erhalten, deren Wanderungsverhalten identisch mit dem von Met- bzw. Leu-Enkephalin ist.

4.) Eine hochgereinigte Leu-Enkephalinfraktion aus Hybridzellextrakten ergibt (1 Experiment bisher) nach Reaktion mit ^{3}H-Dansylchlorid und Chromatographie einen mit Dansyl-Leu-Enkephalin identischen Fleck. Die N-terminale Aminosäure ist Tyrosin. Nach Hydrolyse und Dansylierung werden die im Leu-Enkephalin enthaltenen Aminosäuren gefunden. Wegen sehr schwankender Mengen an Opioiden in Hybridzellen ist die Reproduktion dieses Ergebnisses sehr schwierig. In einem sehr großen Ansatz werden ebenfalls nach Reinigung und Dansylierung Hinweise auf die Anwesen-

heit von Met- und Leu-Enkephalin in Hybridzellextrakten erhalten.

5.) Lokalisation von Enkephalinen mittels der Immunfluoreszenztechnik ist sowohl an fixierten Zellen wie auch an Gefrierschnitten bislang nicht gelungen.

6.) Einbau von ^{35}S-Methionin in Met-Enkephalin bzw. von ^{3}H-Leucin in Leu-Enkephalin durch Hybridzellen ist unter den benutzten Bedingungen nicht meßbar. Die Syntheserate ist möglicherweise zu gering.

7.) Auch in anderen Hybridzellen (108CC5, NH15-CA 2) werden enkephalin-ähnliche Substanzen gefunden. In C6-BU-1-Gliomazellen wird in etwa 40 % der Versuche, in C6-4-2 Gliomazellen in allen Experimenten Opioidaktivität gemessen. In B 82-Fibroblasten kann keine Opioidaktivtät nachgewiesen werden. Nach Auftrennung von Extrakten aus 108CC5- sowie C6-BU-1- und C6-4-2-Zellen mittels der HPLC wird in der Met-Enkephalin- und der Leu-Enkephalin-Fraktion schwache Opioidaktivität gefunden. Das Verhältnis von Met- zu Leu-enkephalin-ähnlichem Material beträgt in 108CC5-Zellen 3 bis 4 : 1, bei den Gliomazellen ist es wegen der Anwesenheit anderer hemmender Substanzen nicht angebbar.

8.) Fötales Kälberserum enthält keine im cyclo AMP-Test meßbaren Opioide, wohl aber Substanzen, die mit dem Anti-Leu-Enkephalin-Antiserum kreuzreagieren. Met- und Leu-Enke-

phalin werden in Gegenwart von FCS rasch inaktiviert. Die Opioide aus Hybridzellen stammen höchstwahrscheinlich nicht aus dem Serum. Hybridzellen enthalten auch nach Dialyse des Serums genauso viel Opioide wie bei Verwendung von unbehandeltem FCS.

Die Hybridzell-Linie 108CC15 ist die erste bekannte Linie, die Met- und Leu-enkephalin-ähnliche Opioidpeptide synthetisiert.

III. Untersuchungen zur Regulation des Opioidpeptidgehalts in Hybridzellen

Zellen in Kultur leben in einer künstlichen Umgebung. Sie haben nur Zell-Zellkontakt mit ihresgleichen und wachsen in einem definierten Medium in Gegenwart von Serum, dessen Zusammensetzung ganz und gar nicht definiert ist. Die Zellen werden an solche in vitro Bedingungen adaptiert. Dabei können Regulationsmechanismen bestimmter Zellfunktionen verändert oder verloren werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die Zellen nun empfindlich werden gegen Veränderungen in den Kulturbedingungen. Solche Veränderungen, wie z. B. die Art des verwendeten Serums oder Mediums, die Brutschranktemperatur, der pH-Wert des Mediums etc. drücken sich eventuell in veränderter Wachstumsgeschwindigkeit und/oder in veränderten Zellfunktionen aus. Deshalb kann es auch, wie bereits erwähnt, in verschiedenen Labors zu unterschiedlichen Befunden kommen, obwohl Zellen desselben Ursprungs verwendet wurden.

Der Einfluß von Kulturbedingungen wirkt sich vielleicht auf den Gehalt von enkephalin-ähnlichem Material in den Hybridzellen aus. Da wir zur Strukturaufklärung dieser Opioide daran interessiert sind, möglichst viel Material aus den Zellen zu gewinnen, müssen optimale Kulturbedingungen gefunden werden. Deshalb wird zunächst der Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen auf den Opioidgehalt untersucht, später der Einfluß einiger Hormone und Drogen.

III. 1. Einfluß der Kulturbedingungen auf den Opioidgehalt

III. 1.1. Vorbemerkung

Wie bereits mehrfach erwähnt, werden bei mehreren Zell-Linien von Experiment zu Experiment stark unterschiedliche Opioidmengen gefunden (bezogen auf mg Protein). Obwohl bei Handhabung und Kultivierung der Zellen nichts bewußt verändert wurde, streuen die Werte im Durchschnitt um einen Faktor 10, ein Faktor 100 ist aber auch möglich. Möglicherweise sind diese Streuungen des spezifischen Opioidgehalts (pmol/mg Protein) zum Teil durch Temperatur- und CO_2-Partialdruck-Schwankungen im Brutschrank bedingt. Der Grund für eine solche Vermutung wird aus der folgenden Abbildung 51 deutlich. Darin ist graphisch dargestellt, wie oft in unseren Laboratorien eine bestimmte spezifische Opioidaktivität in Hybridzellen gefunden wurde, zuerst in Martinsried (A), später in Würzburg (B). Alle in Abb. 51 aufgenommenen Extrakte stammen aus unbehandelten Zellen und sind partiell gereinigt. Weiter gereinigte Extrakte (HPLC, DC, etc.)

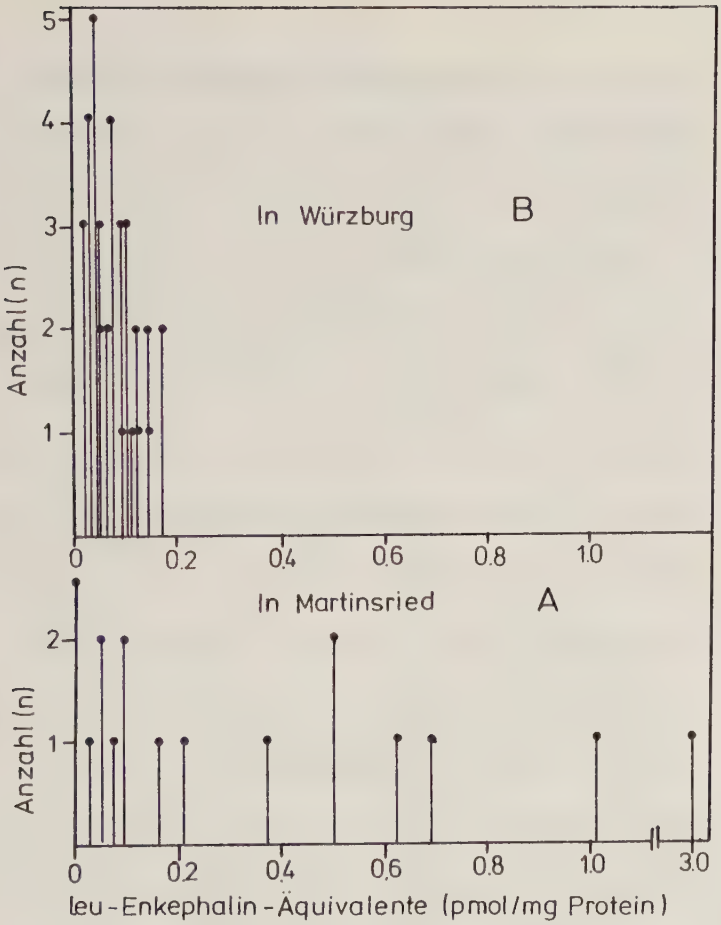


Abb. 51. Häufigkeit spezifischer Opioidaktivitäten in Hybridzellen 108CC15 in verschiedenen Laboratorien.

Alle Extrakte wurden mittels BB, LH-20 gereinigt und stammen von unbehandelten (Kontroll)-Zellen.

wurden nicht mitgezählt. Im Martinsrieder Labor streuten die Werte weit mehr als im Würzburger. In ersterem wurden

die Zellen in verschiedenen Brutschränken kultiviert, die zudem noch bei Experimenten von Kollegen zuweilen häufig geöffnet wurden. Häufiges Öffnen und Schließen eines Brutschrankes aber hat zum Teil erhebliche Schwankungen in Temperatur und CO_2-Partialdruck zur Folge. Das wiederum bewirkt Veränderungen in Temperatur und pH-Wert des mit $NaHCO_3$ gepufferten Wachstumsmediums. Nach dem Umzug wurden die Zellen hauptsächlich in zwei identischen Brutschränken kultiviert, die selten geöffnet wurden und außerdem über eine wesentlich bessere Regulation des CO_2-Partialdruckes verfügen. Allerdings sind die spezifischen Opioidaktivitäten der im Würzburger Labor gezüchteten Zellen sehr niedrig. Wie man aber aus den streuenden Werten erkennen kann, gibt es Bedingungen, unter denen die Zellen wesentlich mehr enkephalin-ähnliches Material produzieren können. Man könnte sich vorstellen, daß ein Fließgleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Enkephaline besteht. Wenn beide Vorgänge relativ schnell sind, hat man es im Zeitmittel bei der "steady state"-Konzentration mit der Differenz großer Zahlen zu tun. Schwankungen in der Syntheserate oder der Abbaugeschwindigkeit haben deshalb überproportional große Auswirkungen auf die momentane Konzentration an Enkephalinen.

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität eines Extraktes mit den im Moment zur Verfügung stehenden Methoden muß dieser aus vielen Zellen (mindestens 100 mg Zellprotein) gewonnen und partiell gereinigt werden. Wegen des damit verbundenen enormen finanziellen und zeitlichen Aufwands war es nur in engem Rahmen möglich, die Regulation des Opioidpeptidgehalts in Hybridzellen zu untersuchen.

II. 1.2. Einfluß der Temperatur im Brutschrank

Abweichungen von ± einem Grad von der normalen Wachstumstemperatur von 37° C hat bereits große Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Bei 36° C wachsen die Hybridzellen bereits deutlich langsamer, während bei 38° C das Wachstum signifikant beschleunigt ist. Der Einfluß der Brutschranktemperatur auf den Gehalt an enkephalin-ähnlichem Material ist in Abb. 52 zu sehen. Bei erhöhter Temperatur

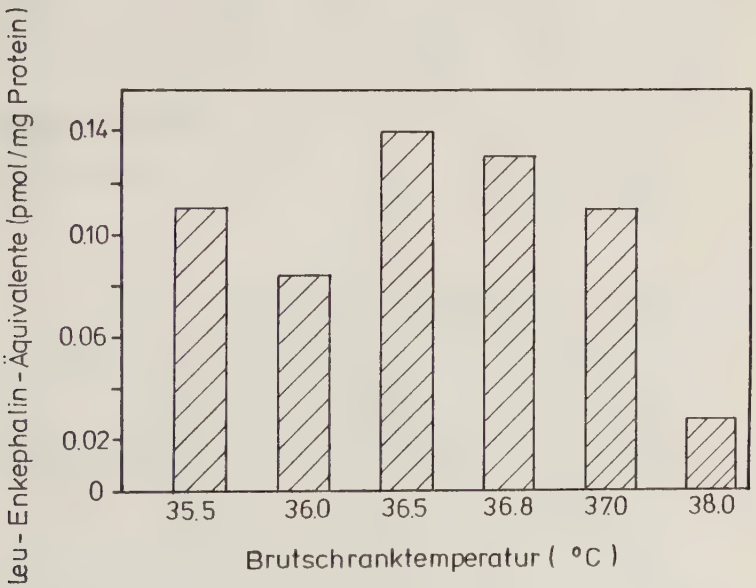


Abb. 52. Einfluß der Brutschranktemperatur auf den Opioidgehalt der Hybridzellen 108CC15.

Die Werte wurden mittels RIA ermittelt und für die Ausbeute an ^{3}H-Leu-Enkephalin korrigiert. Die Zellen für jeden Extrakt stammen aus 14 Petrischalen (Protein pro Platte für die Extrakte von 35.5 - 38.0° C: 6.2; 6.7; 7.8; 7.1; 8.9; 9.4 mg). Die Extrakte sind partiell gereinigt.

(38^{o} C) ist deutlich weniger Opioidaktivität zu messen. Die Zellen sind morphologisch unverändert und vermehren sich deutlich schneller. Um bei der Extraktion allenfalls eine geringfügige Erhöhung der Zelldichte gegenüber Normaltemperatur (37^{o} C) zu erhalten, wurde deshalb ein kleineres Inokulum angesät. Die Erniedrigung des Opioidgehalts beruht also nicht auf der Erhöhung der Zelldichte bei 38^{o} C. Es ist nicht klar, ob die Wachstumsgeschwindigkeit selbst einen regulierenden Einfluß hat. Zu warme Brutschränke (z. B. wegen defekter Temperaturanzeige) kommen als Ursache für niedrige Enkephalinkonzentration in Hybridzellen in der Vergangenheit in Frage. Nach der jetzigen Untersuchung wird für korrekte Einstellung der Brutschranktemperatur auf 37^{o} C gesorgt.

III. 1.3. Einfluß der Zelldichte und Wachstumsdauer

Die Dichte der Zellen in einer Kulturschale beeinflußt manche spezifischen Funktionen dieser Zellen, andere dagegen bleiben unverändert. Als mögliche Ursachen seien Zell-Zell-Kontakte und Konditionierung des Mediums und damit die Einflußnahme von Zellen aufeinander genannt. Beispiele für eine Stimulation einer Eigenschaft bei erhöhter Zelldichte sind der VIP-Gehalt in bestimmten Neuroblastomazellen (191), die cyclo AMP-Konzentration nach PGE_1- Zugabe in Hybridzellen 108CC15 (82) und die Tyrosinhydroxylaseaktivität in NH15-CA 2-Hybrid-Hybriden (186, 187) und anderen Neuroblastomazellen (192). Die spezifische Aktivität der

Cholinacetyltransferase in Hybridzellen 108CC15 dagegen steigt zuerst an und fällt bei höherer Zelldichte wieder ab (76).

Um zu sehen, ob durch hohe Zelldichten der Opioidgehalt in Hybridzellen gesteigert wird, werden zwei im Ansatz verschiedene Experimente durchgeführt. Einmal wird jedesmal die gleiche Menge an Zellen angesät und der Extrakt an jeweils aufeinanderfolgenden Tagen präpariert (Abb. 53 A). Beim zweiten, parallelen Versuch wird jeweils eine unterschiedliche Zellzahl angesät und alle Extrakte werden nach 4 Tagen zur gleichen Zeit hergestellt (Abb. 53 B).

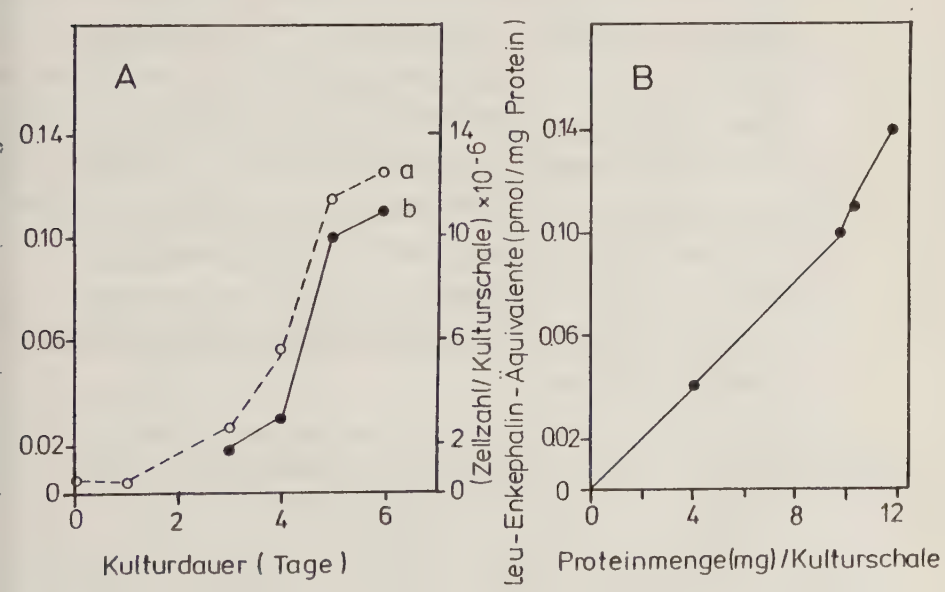


Abb. 53. Einfluß der Kulturdauer (A) und der Zelldichte (B) auf den Opioidgehalt von Hybridzellen 108CC15.

Die Extrakte stammen aus Zellen (P 15) von 12 - 14 Petrischalen. Die Werte wurden mittels RIA bestimmt. Reinigung der Extrakte s. S. 104.

A: Zellzahl pro Kulturschale (Kurve a), spezifische Opioidaktivität (Kurve b).

Mit der Zellzahl pro Kulturschale steigt unter beiden Versuchsbedingungen die spezifische Opioidaktivität stark an. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß ca. 1 x 10^6 Zellen 1 mg Protein entsprechen, stimmen die Werte aus beiden Kurven gut überein. Um die gleichen Bedingungen wie bei den sonstigen Versuchen zu haben, wurde das Wachstumsmedium nicht täglich gewechselt, wie es sonst bei der Aufnahme von Wachstumskurven üblich ist.

Neben der Temperatur im Brutschrank hat nun auch die Zelldichte erheblichen Einfluß auf den Opioidgehalt. Da bei höherer Temperatur (38° C) die Zelldichte am Ende der Wachstumsperiode größer, der Opioidgehalt aber geringer ist als bei 37° C, ist das ein weiterer Hinweis dafür, daß die Zelldichte nicht für die Erniedrigung verantwortlich ist. Zellen höherer Passagenzahl proliferieren schneller als solche mit niedriger (193). Ungleiche Zelldichten am Ende bei gleichem Inokulum sind die Folge. Derartige Schwankungen in der Zelldichte, eventuell gepaart mit Temperaturschwankungen, können so erhebliche Schwankungen im Opioidgehalt der Hybridzellen zur Folge haben.

III. 1.4. Einfluß verschiedener fötaler Kälberseren im Wachstumsmedium auf den Opioidgehalt der Hybride

Zellen in Kultur werden meist in Gegenwart von FCS gezüchtet. Kommerziell sind immer nur bestimmte Mengen einer Charge erhältlich. Deshalb kommen über einen längeren Zeitraum verschiedene Seren zum Einsatz. Wenngleich diese Seren so aus-

gesucht sind, daß alle die Proliferation der Zellen in gleicher Weise fördern, können durchaus andere Funktionen unterschiedlich beeinflußt werden.

Glucocorticoide erniedrigen den ß-Endorphin-Gehalt in der Mäusehypophysen-Tumorzell-Linie AtT-20 um 50 - 75 % (194). Möglicherweise haben diese Hormone auch Einfluß auf den Enkephalingehalt in Hybridzellen. Da im Serum solche Steroidhormone enthalten sind, eventuell von Charge zu Charge in unterschiedlichen Mengen, könnte so über das Serum der Opioidgehalt reguliert werden. Deshalb wurde der Einfluß verschiedener Seren auf den Opioidgehalt der Hybride geprüft (Tab. 19). Nur bei zwei Seren (II, III) wird unerwartet ein stimulierender Einfluß gefunden. Von Charge II war keine weitere, von Charge III waren nur noch wenige Flaschen verfügbar. Der Faktor der Stimulation des Opioidgehaltes in Hybridzellen mit Serum III gegenüber den meistens benützten Seren IV - VI schwankt zwischen 1.5. und 3.5. Es ist noch unklar, ob diese Stimulation zu anderen stimulatorischen Effekten additiv ist. Da für die meisten Experimente die Seren IV - VI verwendet wurden, kommt FCS als Ursache für Schwankungen im Opioidgehalt nicht in Frage.

Ohne Daten zu bringen, sei noch erwähnt, daß in einigen Experimenten ein Wechsel des Wachstumsmedium gegen serumfreies Medium 10 h vor Extraktion eine Erhöhung des Opioidgehalts zur Folge hatte. Der Stimulationsfaktor lag zwischen 1 und 10. Eine mindestens zweifache Stimulation bei sehr

Tab. 19. Einfluß verschiedener fötaler Kälberseren auf den Opioidgehalt von Hybridzellen

Chargen-Nummer	Proteinmenge pro Kulturschale (mg)	Leu-Enkephalin-Äquivalente (pmol/mg Protein)
K 377 401 S (I)	11.3	0.02
T 173 001 D (II)	9.5	0.04
K 473 101 D (III)	8.6	0.05
L 872 801 D (IV)	11.3	0.02
K 189 201 S (V)	10.5	0.02
T 095 001 S (VI)	8.6	0.02

Zellen (P 13) aus jeweils 14 Petrischalen wurden extrahiert. Reinigung der Extrakte s.S. 104.

hohen Zelldichten ist reproduzierbar. Bei einigen anderen Versuchen dagegen wurde keine Änderung beobachtet. Dieser Effekt wurde noch nicht eingehend untersucht. Daher muß auf eine ausführliche Behandlung verzichtet werden.

III. 2. Einfluß von Hormonen und Drogen auf den Opioidgehalt in Hybridzellen

In der Hierarchie der hormonellen Regulation im Körper regulieren spezielle Peptidhormone durch Stimulierung oder Hemmung die Freisetzung anderer Hormone. Diese selbst können wiederum steuernd auf manche der ersteren Hormone einwirken. Es ergeben sich so biologische Regelkreise. Nur wenig ist über die Rolle von Enkephalinen und Endorphinen bei solchen Regelkreisen bekannt. ß-Endorphin sowie Met- und Leu-Enke-

phalin regulieren z. B. die Freisetzung von Prolactin und Wachstumshormonen aus der Hypophyse (Übersichtsartikel 195). Andererseits bewirkt Acetylcholin die Freisetzung von Opioiden zusammen mit Catecholaminen aus den chromaffinen Zellen der adrenalen Medulla (196). Da die Hybridzellen AcCh synthetisieren (197) und es auch freisetzen (198), könnte es über die auf den Zellen vorhandenen AcCh-Rezeptoren den Enkephalingehalt regulieren. Um zu sehen, ob auch in Hybridzellen der Opioidgehalt hormonell regulierbar ist, wurde der Einfluß verschiedener Hormone und Drogen gemessen.

II. 2.1. Einfluß verschiedener Hormone und Drogen

Neben der eben erwähnten Erniedrigung der intrazellulären Opioidkonzentration durch AcCh in der adrenalen Medulla kann noch durch weitere Substanzen die Opioidmenge reguliert werden. Reserpin, das die Entleerung von catecholaminhaltigen Speichervesikeln bewirkt, stimuliert die de novo Synthese von Met- und Leu-Enkephalin in chromaffinen Zellen (148). Benzodiazepine erniedrigen die Enkephalinmengen im Striatum von Ratten um 25 %, wobei dieser Effekt aber wahrscheinlich indirekt über GABA-erge Neuronen erzeugt wird (GABA = γ-Aminobuttersäure) (199). Im Hypothalamus dagegen wird der Met-Enkephalin-Spiegel, wahrscheinlich durch verringerte Freisetzung, um 33 % erhöht (199). Morphin und Haloperidol haben in Kurzzeitversuchen keine Änderung des Enkephalingehalts im Gehirn zur Folge (200, 201). Nach einem anderen Bericht wird aber bereits

1 h nach Morphininjektion eine 25 %ige Erhöhung des Enkephalingehalts im Rattengehirn festgestellt (202). In toleranten und süchtigen Ratten ist der Enkephalingehalt um etwa 75 % erhöht (202). Die Gesamtkonzentration an Enkephalin im Gehirn wird durch Adrenalektomie (203) und Hypophysektomie (49) nicht verändert. Hormone aus diesen beiden Drüsen haben also keinen regulatorischen Einfluß auf den Opioidgehalt im Gehirn. Dexamethason, ein synthetisches Glucocorticoid, erhöht aber, in großen Dosen verabreicht, die Enkephalinkonzentrationen im Striatum (203). Vom Effekt des Dexamethasons auf Hybridzellopioide wird im nächsten Kapitel die Rede sein.

In Tab. 20 sind die Konzentrationen an Opioiden in Hybridzellen nach Behandlung mit den erwähnten Hormonen und Drogen aufgelistet. Eine reproduzierbare, signifikante Erhöhung des Gehalts an enkephalin-ähnlichem Material wird nur durch Dexamethason erhalten. Die leichte Erhöhung durch Carbachol in diesem Experiment ist nicht reproduzierbar, die durch Reserpin noch nicht weiter untersucht. Dem negativen Befund mit Carbachol stehen die Daten gegenüber, die an der adrenalen Medulla erhalten wurden (196). Der Unterschied liegt möglicherweise in einem unterschiedlichen Differenzierungsgrad begründet. Die Hybridzellen differenzieren erst in Gegenwart von DBCA und werden elektrisch erregbar (75, 76). Ob unter solchen Bedingungen cholinerge Agonisten verstärkt enkephalin-ähnliche Peptide freisetzen können, bleibt noch zu untersuchen. Mit Naloxon, nicht da-

Tab. 20. Einfluß von Hormonen und Drogen auf den Opioidgehalt in Hybridzellen

Zusatz zum Wachstumsmedium (/uM)	Protein/Platte (mg)	Leu-Enkephalin-Äquivalente (pmol/mg Protein)
-	7.6	0.14
Morphin (1)	9.9	0.09
Naloxon (100)	8.9	0.08
Carbachol (1)	6.7	0.23
Atropin (10)	8.7	0.11
Reserpin (1)	9.4	0.19
Diazepam (1)	8.5	0.13
Dexamethason (1)	7.7	0.41

Alle Drogen waren während der gesamten Wachstumsphase zugegen. Die Werte wurden mit Hilfe des RIA ermittelt.

Die Extrakte stammen aus den Zellen (P 20) von je 11 - 14 Petrischalen und sind partiell gereinigt.

gegen mit Morphin, wird auch in anderen Versuchen eine allerdings immer nur kleine Erniedrigung gefunden. Ob diesem Befund eine regulatorische Bedeutung zukommt, ist noch nicht klar. Der Effekt scheint dafür zu klein zu sein.

Bei Anwesenheit von 1 mM N^6, $O^{2'}$-Dibutyryl-cyclo AMP (DBCA) im Wachstumsmedium senden die Hybridzellen lange Fortsätze aus (75, 77). Außerdem werden die Zellen unter anderem elektrisch erregbar und die Cholinacetyltransferase-Aktivität steigt stark an (75, 76). Auf den Opioidgehalt hat DBCA kaum einen Einfluß. Gelegentlich wird eine kleine Erhöhung

(ca. 30 %) beobachtet. Wird der cyclo AMP-Spiegel während der Wachstumsphase durch Zusatz des Phosphodiesterase-hemmers RO 20-1724 erhöht, findet man überhaupt keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Konditioniertes Medium von C6-4-2-Glioma Zellen enthält Faktoren, die die Cholinacetyltransferase-Aktivität in NH 15-CA 2-Hybrid-Hybrid-Zellen stimulieren (204). Es wurde geprüft, ob solches Medium auch die Opioidaktivität in 108CC15-Hybridzellen erhöht. In zwei von drei Experimenten wurde eine leichte Erhöhung (1.5-fach) gefunden (Daten nicht gezeigt). Da im konditionierten Medium aber enkephalinähnliche Opioide enthalten sind (s. Kap. II. 4. S.135), könnte die Erhöhung nicht durch gesteigerte Synthese, sondern durch Aufnahme aus dem Medium zustande kommen. Das konditionierte Medium, mit dem kein Effekt auf Hybridzellen zu erzielen war, enthielt auch keine meßbaren Opioidmengen. Insgesamt aber sind noch viel mehr Experimente nötig, um definitiv von einem Effekt des konditionierten Mediums auf die Opioidkonzentration in Hybridzellen sprechen zu können.

III. 2.2. Einfluß von Steroidhormonen

Aus Tab. 20 geht hervor, daß das synthetische Glucocorticoid Dexamethason die spezifische Opioidkonzentration in Hybridzellen erhöht. Die Stimulation ist in den meisten Fällen 3-5 fach, kann aber im Extremfall nur 2-fach oder aber gar 10-fach sein. Der Effekt ist spezifisch für

Glucocorticoide; Steroidhormone wie Progesteron und Testosteron sind wirkungslos (Tab. 21). Das Mineralcorticoid Aldosteron hat ebenfalls eine leicht stimulatorische Wirkung. In anderen Systemen, in denen Glucocorticoide eine spezielle Eigen-

Tab. 21. Einfluß von Steroidhormonen auf den Opioidgehalt in Hybridzellen

Zusatz zum Medium (µM)	Protein/Platte (mg)	Leu-Enkephalin-Äquivalente (pmol/mg Protein)
-	6.8	0.05
Dexamethason (1)	6.9	0.18
Corticosteron (1)	8.2	0.17
Aldosteron (1)	7.2	0.10
Testosteron (1)	8.6	0.04
Progesteron (1)	7.4	0.05

Alle Hormone waren während der gesamten Wachstumsphase (4 Tage) zugegen. Die Werte wurden mit Hilfe des RIA ermittelt.

Die Extrakte stammen von Zellen (P 20) aus je 12 - 14 Petrischalen und sind partiell gereinigt.

schaft stimulieren, wird eine ähnliche Potenzreihe der Steroidhormone gefunden, z. B. bei der Induktion der Glutaminsynthetase in Primärkulturen von Gehirnen neugeborener Mäuse (205). Es gibt derzeit noch keine Hinweise darauf, ob durch Dexamethason die Enkephalinsynthese direkt induziert wird oder z. B. eines oder mehrere der Enzyme, die möglicherweise Met- und Leu-Enkephalin aus einem Vorläufermolekül freisetzen. Des weiteren wäre ein Einfluß von

Dexamethason auf die Geschwindigkeit des Abbaus oder der Freisetzung denkbar. Eine verringerte Freisetzung von Prostaglandinen nach Hydrocortisongabe wurde berichtet (206). Die Erhöhung der Opioidkonzentration durch FCS zweier, bestimmter Chargen (Tab.19,S.155) ist möglicherweise die Folge höherer Glucocorticoid-Konzentrationen als im FCS anderer Herkunft. Glucocorticoid-Rezeptoren werden im Rattengehirn vorwiegend im Hippocampus, dem Septum und der Amygdala gefunden (Übersichtsartikel 207, 208), Regionen, in denen nur wenig Enkephalin vorhanden ist. Dexamethason bindet nur sehr schwach an die Rezeptoren im Hippocampus, dafür aber mit hoher Affinität an Rezeptoren in verschiedenen anderen Hirnregionen, besonders in der Hypophyse (207). Dieser Befund wird durch die Existenz zweier Klassen von Glucocorticoidrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität für Steroide erklärt. Die beiden Typen sind aber noch nicht näher charakterisiert worden. Deswegen ist es auch unklar, welcher Rezeptortyp in den Hybridzellen vorkommt. Man vermutet, daß auch das Mineralcorticoid Aldosteron im Gehirn über Glucocorticoidrezeptoren wirkt (207). Dies mag auch für Hybridzellen gelten. Auch Progesteron kann in vitro an Glucocorticoidrezeptoren binden und wird auch rezeptormediiert in die Zellkerne transportiert (207). Ob das allerdings für beide postulierten Glucocorticoidrezeptortypen gilt, ist unbekannt. Vielleicht liegt darin die fehlende stimulatorische Wirkung von Progesteron auf den Opioidgehalt in Hybridzellen begründet.

In Hirnregionen, die viel Enkephalin enthalten, fehlen Glucocorticoidrezeptoren. Für diese Zellen können Hybridzellen hinsichtlich der Enkephalinsynthese kein Modell sein. Ein Modell abgeben können sie aber für die adrenalen Medullazellen, die ebenso wie die Hybridzellen Enkephaline enthalten. Diese Zellen besitzen auch Glucocorticoidrezeptoren. Ein Einfluß von Glucocorticoiden auf den Enkephalingehalt der Medullazellen ist aber bislang nicht bekannt. Nur im Striatum von Mäusen werden bei Verabreichung von sehr hohen Dosen Dexamethason über einen längeren Zeitraum die Met- und Leu-Enkephalin-Konzentrationen erhöht (203). Allerdings steigen die Enkephalin-Konzentrationen in diesem Organ als Antwort auf verschiedene, chronische Behandlungen, z. B. auf die chronische Verabreichung von Haloperidol, Reserpin und Lithium^{+}(209, 210).

Wie bereits erwähnt, wird die ß-Endorphin-Synthese in vitro durch Glucocorticoide in Hypophysenzellen gehemmt (194). Auch in vivo wird durch Dexamethason der ß-Endorphin-Gehalt in der Adenohypophyse erniedrigt, durch Adrenalektomie aber erhöht (203). Das gilt nicht für ß-Endorphin in der Pars intermedia. ß-Endorphin und Enkephaline werden also zumindest in Zellkultursystemen durch Glucocorticoide entgegengesetzt reguliert. Das mag ein weiterer Hinweis darauf sein, daß beide Systeme unabhängig voneinander sind.

In etwa 40 % der Extrakte aus C6-BU-1-Gliomazellen ist enkephalin-ähnliches Material enthalten. Die Opioidkonzentra-

tion in diesen Zellen wird durch Dexamethason nicht erhöht (Tab. 22). Wenn im Kontrollextrakt keine Opioidaktivität

Tab. 22. Effekt von Dexamethason auf den Opioidgehalt in C6-BU-1-Glioma-Zellen

Experiment	Leu-Enkephalin-Äquivalente (pmol/mg Protein)	
	- Dexamethason	+ 1 µM Dexamethason
I	0.22	0.21
II	nicht meßbar	nicht meßbar

Dexamethason war 4 Tage im Wachstumsmedium.
Die Werte wurden im Hilfe des RIA ermittelt.
Die Zellen für die Extrakte stammen je aus 14 - 19 Petrischalen mit je 7 - 8.5 mg Protein.

nachweisbar ist (Experiment II), kann auch im Parallelextrakt mit Dexamethason keine solche erwartet werden. In C6-BU-1-Zellen induziert Dexamethason aber die Glutaminsynthetase (205). Rezeptoren für Dexamethason sind also vorhanden. Die Regulierbarkeit des Enkephalingehaltes in Hybrid- und Gliomazellen scheint demnach unterschiedlich zu sein. Dem Glucocorticoid-effekt auf die Hybridzellopioide kommt deshalb eine gewisse Spezifität zu.

III. 2.3. Charakterisierung des stimulatorischen Effekts von Dexamethason auf den Opioidgehalt in Hybridzellen

Um die Stimulation des Opioidgehaltes durch Dexamethason zu optimieren, wurden die Einflüsse von Inkubationsdauer und

Konzentration bestimmt. Abb. 54 zeigt die Abhängigkeit der Opioidkonzentration von der Dauer der Inkubation der Zellen mit Dexamethason. Bereits 24 h nach Dexamethasonzugabe ist

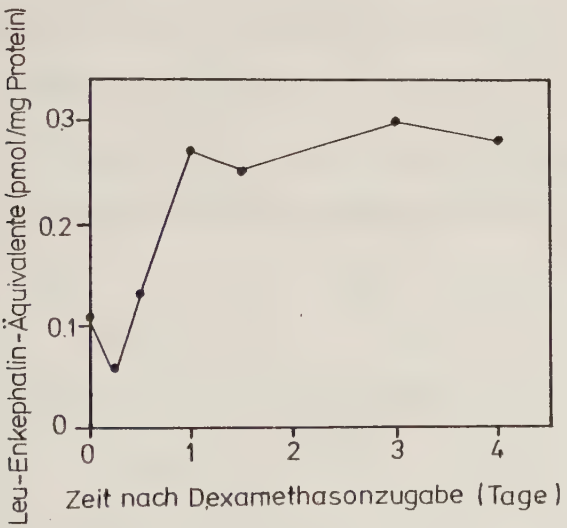


Abb. 54. Einfluß der Inkubationsdauer mit Dexamethason auf die Opioidkonzentration in Hybridzellen.
Dexamethason (50 µM Lösung) wurde zu der angegebenen Zeit vor Extraktion der Zellen zum Wachstumsmedium zugegeben. Endkonzentration 1 µM. Die Extrakte stammen aus Zellen (P 18) von je 12 - 14 Petrischalen (Protein 9 - 10 mg pro Platte). Die Werte wurden mit Hilfe des RIA bestimmt.

ein Maximalwert erreicht. In anderen Versuchen ist dies erst nach 36 bis 72 h der Fall. Zeitliche Schwankungen der Induktion werden auch in anderen Systemen gefunden (208). Maximale Induktion der Glutaminsynthetase in Primärkulturen aus Gehirnen

neugeborener Mäuse durch Dexamethason findet man ebenfalls nach 36 h (205).

Abb. 55 beinhaltet die Abhängigkeit der Opioidkonzentration von der Dexamethason-Konzentration im Wachstumsmedium. Maximale Induktion erhält man mit 1 µM Dexamethason. Für einen physiologischen Effekt erscheint diese Konzentration zu hoch zu sein. Ein ähnlicher Versuch mit dem natürlichen Glucocorticoid Corticosteron steht noch aus. Allerdings werden viele der berichteten Glucocorticoideffekte im Gehirn erst bei langdauernder Behandlung mit hohen Dosen an Hormon

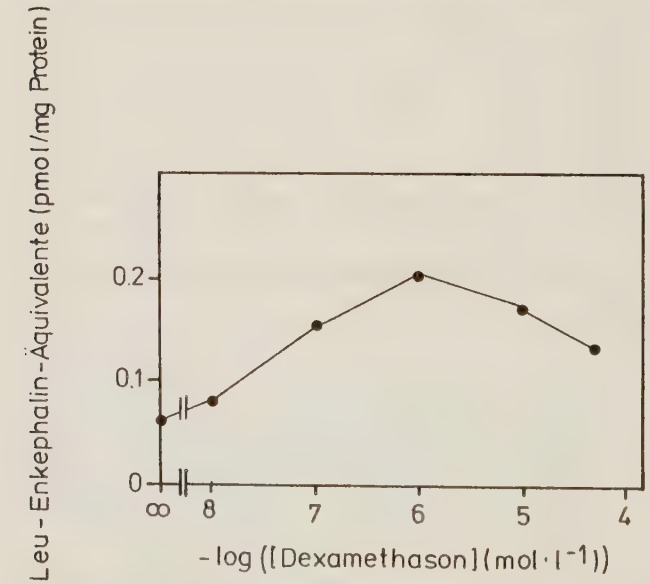


Abb. 55. Einfluß der Dexamethasonkonzentration auf den Opioidgehalt in Hybridzellen.

Dexamethason war während der gesamten Wachstumsphase (4 Tage) zugegen. Die Werte wurden mit Hilfe des RIA ermittelt. Die Extrakte stammen aus Zellen (P 20) von je 11 - 15 Petrischalen und sind partiell gereinigt.

erzielt (208). Es ist nicht klar, warum ab einer Konzentration von 10 /uM der intrazelluläre Opioidgehalt absinkt. Möglicherweise treten ab dieser Konzentration Membranperturbationen auf, die zu einer erhöhten, unspezifischen Freisetzung der enkephalin-ähnlichen Substanzen führen. Hybridzellen enthalten Met- und Leu-enkephalin-ähnliches Material. Die Konzentration beider Peptide wird durch Dexamethason erhöht (Abb. 56). Die Fähigkeit, den Anstieg des cyclo AMP-Spiegels durch PGE_1 zu unterdrücken, ist nach Dexamethason sowohl in der Met- als auch der Leu-Enkephalin Fraktion gesteigert. Das Verhältnis von Met- zu Leu-enkephalin-ähnlichem Material ist 3.3 : 1 ohne und 2.9 : 1 mit Dexamethason. Der Gehalt an beiden Peptiden wird also in gleicher Weise erhöht. Gleiches gilt für den Effekt von Dexamethason auf die Enkephalinkonzentration im Striatum (203) und - wie schon erwähnt - für die Hybridzellen 108CC5. Die Aktivität aller Fraktionen (Abb. 56 A - D) wird durch Naloxon vollständig aufgehoben (Daten nicht gezeigt).

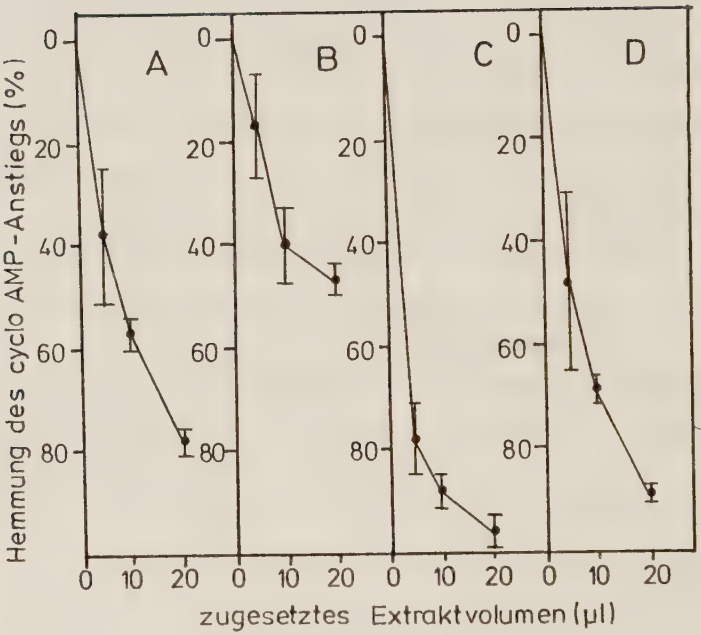


Abb. 56. Einfluß von Dexamethason auf den Gehalt an Met- und Leu-enkephalin-ähnlichem Material.

1 µM Dexamethason war 4 Tage zugegen.
Die Werte wurden im cyclo AMP-Test ermittelt.

Die Extrakte (aus je ca. 2 x 10^8 Zellen, P 15, 30 Petrischalen), wurden über BB/LH-20/HPLC gereinigt.

Met-Enkephalin-Fraktion (A, Ausbeute 25 %) und Leu-Enkephalin-Fraktion (B, Ausbeute 34 %) in Abwesenheit(A,B) und Anwesenheit (C,D) von Dexamethason

(C, 20 % und D, 28 % Ausbeute).

Endvolumen der Fraktionen 200 µl.

2.2 x 10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 96 %, P 17), maximaler cyclo AMP-Wert 405 ± 45 pmol/mg Protein.

II. 3. Versuche zur Freisetzung von Opioiden aus Hybridzellen

Man vermutet, daß die Enkephaline Neurotransmitter oder Neuromodulatoren sind (211). Neurotransmitter werden, soweit bekannt, in Vesikeln gespeichert. Auch Met- und Leu-Enkephalin sind wahrscheinlich in Vesikeln enthalten. Bei subzellulärer Fraktionierung von Rattengehirn werden sie in der Synaptosomenfraktion angereichert (212). In den Catecholaminspeichervesikeln der chromaffinen Zellen aus der adrenalen Medulla sind ebenfalls Enkephaline gespeichert (196, 213).

Eine Eigenschaft von Neurotransmittern ist, daß sie bei Depolarisation der Neuronen in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden. Für eine solche Ausschüttung ist die Anwesenheit von Ca^{2+} erforderlich. In Versuchen in vitro wird eine Depolarisation der Zellen u. a. durch eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration erreicht. Unter diesen experimentellen Bedingungen werden auch Enkephaline aus Zellen verschiedener Hirnregionen ins Medium abgegeben (214-218). Die Menge der in einer bestimmten Zeitspanne freigesetzten Enkephaline liegt bei den verschiedenen Autoren zwischen 2 und 10 % des gesamten Enkephalins in dem betreffenden Gewebe.

Es wurde überprüft, ob auch die enkephalin-ähnlichen Peptide aus Hybridzellen durch Erhöhung der K^+ -Konzentration auf 56 mM verstärkt ins Medium abgegeben werden. Tab. 23 zeigt, daß die intrazelluläre Opioidkonzentration nach

Inkubation mit hohem K^+ leicht abnimmt. Im Medium aber nimmt die Opioidkonzentration nicht zu, sondern ab. Mög-

Tab. 23. Spontane, K^+ und Kyotorphin induzierte Freisetzung von Enkephalinen aus Hybridzellen

Zusammensetzung des Mediums	spezifische Opioidaktivität (pmol/mg Protein)			
	Exp. I		Exp. II	
	ohne Dexamethason		mit Dexamethason	
	intra- zellulär	extra- zellulär	intra- zellulär	extra- zellulär
Kontrolle	0.060	0.050	0.47	nicht meßbar
56mM K^+	0.044	0.020	0.40	nicht meßbar
Kontrolle, kein Ca^{2+}	nicht gemessen		0.57	nicht meßbar
56mM K^+, kein Ca^{2+}	0.260	0.027	0.53	nicht meßbar
1 µM Kyotorphin	0.043	0.030	0.29	nicht meßbar
Kyotorphin, kein Ca^{2+}	nicht gemessen		0.28	nicht meßbar

Inkubation jeweils 40 min bei 37°C, 10 ml Medium pro Petrischale. Für jeden Extrakt wurden Zellen aus 10 - 14 Petrischalen verwendet (P 17, 11 mg Protein/Platte, für Exp. I, P 22, 6 mg Protein/Platte für Exp. II). Dexamethason (1 µM) war für 4 Tage zugegen.

licherweise wird freigesetztes Enkephalin rasch abgebaut. Dies wird auch von anderen Autoren berichtet (214-218). Zusatz von Bacitracin zum Medium hat aber bei Hybridzellen keinen Effekt (Daten nicht angegeben). Bacitracin hemmt in manchen Systemen den Abbau von Enkephalinen (s. Kap. II., 2.4., S. 105). Es wird vermutet, daß freigesetzte Enkephaline noch an der Zelloberfläche zum Teil so schnell

abgebaut werden, daß nur wenig Material in das umgebende Medium gelangt (217). In Abwesenheit von externem Ca^{2+} steigt die intrazelluläre Opioidkonzentration in den Zellen zum Teil stark an. Dieser Effekt ist aber in seiner Größe von Experiment zu Experiment unterschiedlich (1.5 - 4.3 fach). Möglicherweise wird die spontane Enkephalinfreisetzung unter diesen Bedingungen stark verlangsamt. Eine schnelle Synthese von Enkephalinen in den Hybridzellen ist aber eine Voraussetzung dieser Erklärung. Allerdings soll die spontane Ausschüttung von Enkephalinen Ca^{2+}-unabhängig sein (217). Zur endgültigen Klärung der genannten Befunde sind noch weitergehende Studien notwendig.

Kyotorphin, das Dipeptid Tyr-Arg, setzt Met-Enkephalin aus dem Striatum von Ratten frei (219). Es soll zudem den enzymatischen Abbau von Met-Enkephalin inhibieren (219). Kyotorphin erniedrigt auch in Hybridzellen den intrazellulären Opioidgehalt (Tab. 23). Wiederum wird freigesetztes Enkephalin wahrscheinlich rasch abgebaut. Die Freisetzung von Enkephalinen aus Hybridzellen durch Kyotorphin ist Ca^{2+}-unabhängig (Tab. 23). Nach Kyotorphin ist der intrazelluläre Opioidspiegel in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} gleich. Über den Wirkungsmechanismus von Kyotorphin ist noch nichts bekannt. Sicher ist, daß es keine eigene Opioidwirkung besitzt (219).

Hybridzellen synthetisieren, wie schon erwähnt, AcCh. Dieses wird durch Erhöhung der K^+-Konzentration nur freigesetzt, wenn die Zellen vorher durch Behandlung mit DBCA (3 - 5 Tage) differenziert werden (198). Trotzdem wird weniger als 1 % des intrazellulären Acetylcholins durch Depolarisation ausgeschüttet.

Es wurde nun untersucht (Daten nicht gezeigt), ob nach DBCA-Behandlung mehr enkephalin-ähnliche Substanzen bei Depolarisation der Zellen freigesetzt werden. Nach 3-tägiger Inkubation mit 1 mM DBCA wird bei Erhöhung der K^+-Konzentration keinerlei Abnahme des intrazellulären Opioidgehalts gefunden. Nur in Gegenwart von Kyotorphin tritt wiederum eine Abnahme um 40 % auf. Im Gegensatz zum AcCh-System wird die K^+ -induzierte Opioidfreisetzung nach DBCA-Behandlung nicht gesteigert. Es gibt drei Erklärungsmöglichkeiten für diesen negativen Befund, die aber noch nicht weiter untersucht wurden: a) Um die Opioidkonzentration in den Hybridzellen zu erhöhen, sind die Zellen in Gegenwart von DBCA und Dexamethason kultiviert worden. Es ist derzeit noch nicht bekannt, ob Dexamethason mit der Wirkung von DBCA auf die Zellen interferiert und eventuell die Induzierbarkeit des Freisetzungsmechanismuses verhindert. b) Wenn, in Analogie zu AcCh, nur ca. 1 % der intrazellulären Opioidmenge ausgeschüttet wird, könnte dieser Betrag mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht festgestellt werden. c) DBCA-Behandlung hat auf den Freisetzungsmechanismus von Opioiden aus Hybridzellen keinen Einfluß. Bei Zellen ohne DBCA-Behand-

lung kann der intrazelluläre Opioidgehalt durch Depolarisation erniedrigt werden, nicht dagegen bei Zellen mit DBCA-Behandlung. Diese Diskrepanz kann im Moment noch nicht erklärt werden.

4. Versuche zur Freisetzung von Enkephalinen aus einem hypothetischem Vorläufermolekül im Homogenat

Met- und Leu-Enkephalin werden wahrscheinlich, wie vermutlich alle anderen Peptidhormone, ribosomal in Form einer inaktiven Vorstufe synthetisiert. Für die Enkephaline aus der adrenalen Medulla sind solche Vorläufermoleküle bereits bekannt (50, 51). Wenn auch in Hybridzellen derartige Vorläufermoleküle existieren, könnte durch Inkubation von Hybridzellhomogenaten endogenes Enkephalin enzymatisch aus dem Vorläufer freigesetzt werden. Tab. 24 zeigt Ergebnisse solcher Versuche in An- und Abwesenheit von Bacitracin und Puromycin, Inhibitoren des Enkephalinabbaus. Das Ausmaß der Aktivierung schwankt von Experiment zu Experiment. Unterschiede im Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau mögen Ursache dafür sein. In Gegenwart von Bacitracin tritt in beiden Versuchen eine mäßige bis deutliche Steigerung der Menge an immunreaktivem Material auf. Es muß noch gezeigt werden, ob es sich dabei tatsächlich um Met- oder/und Leu-Enkephalin handelt. Der im Rattengehirnhomogenat potente Inhibitor des Enkephalinabbaus, Puromycin (158, 159), ist im Hybridzellhomogenat allenfalls schwach wirksam.

Tab. 24. Opioidkonzentrationen in Hybridzellhomogenaten mit und ohne Inkubation bei 37° C.

Behandlung des Homogenats und Zusätze (/uM)	spezifische Opioidaktivität (pmol/mg Protein)		
	Exp. I	Exp. II	Exp. III
nicht inkubiert	0.05	0.14	0.05
15 min inkubiert	0.11	0.08	0.07
inkubiert + Bacitracin (500)	-	0.17	0.14
inkubiert + Puromycin (1)	-	-	0.07

Die Homogenate (aus je 11 - 15 Petrischalen) wurden durch zweimaliges Einfrieren der Zellsuspension (in 30 ml Hepes-Medium ohne Phenolrot) in flüssigem Stickstoff und langsames Auftauen erhalten. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von 30 ml 20 % TCA gestoppt. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie es für partiell gereinigte Extrakte im Experimentellen Teil beschrieben ist.
Die Werte wurden mit Hilfe des RIA ermittelt. Zellen der Passagen 23, 10.8 mg Protein/Platte (Exp. I), 19, 11.0 mg Protein/Platte (Exp. II) und 14, 10.6 mg Protein/Platte (Exp. III) wurden verwendet.

Auch in diesem Punkt können erst weitere Experimente (wie z. B. Kinetiken, Zusatz von Trypsin ± Carboxypeptidase B zum Homogenat, Auftrennen des Homogenats und Suche nach Vorläufermolekülen etc.) klären, ob und gegebenenfalls wie die Freisetzung von Enkephalinen aus ihren Vorläufermolekülen erfolgt.

III. 5. Zusammenfassung

1.) Die Konzentrationen an Met- und Leu-enkephalin-ähnlichen Substanzen in Hybridzellen schwanken zum Teil beträchtlich von Experiment zu Experiment. Die Ursachen dafür liegen

wahrscheinlich in Änderungen der Kulturbedingungen begründet. Schwankungen im pH-Wert des Wachstumsmediums ($NaHCO_3$-gepuffert!) und der Temperatur im Brutschrank bzw. die Kombination beider sind mögliche Ursachen. Bei einer Temperaturerhöhung von 37^{o} C auf 38^{o} C wird trotz schnelleren Zellwachstums deutlich weniger enkephalin-ähnliches Material gebildet.

2.) Bei hoher Zelldichte steigt die spezifische Opioidaktivität in den Hybridzellen stark an. Bestimmte Chargen fötalen Kälberserums, zum Wachstumsmedium zugegeben, erhöhen die Opioidkonzentration in den Hybridzellen. Die Ursache ist eine mögliche höhere Glucocorticoidkonzentration in diesen betreffenden Seren gegenüber solchen, die keinen Effekt ausüben. Die Verwendung verschiedener fötaler Kälberseren kann aber die beobachteten Schwankungen des Opioidgehaltes nicht erklären, da fast ausschließlich Seren der Chargen benützt wurden, die keine Erhöhung des Opioidgehalts bewirken.

3.) Der Gehalt an enkephalin-ähnlichem Material in den Hybridzellen wird, im Gegensatz zu anderen Systemen, nicht über Autorezeptoren, Acetylcholin- oder Benzodiazepin-Rezeptoren reguliert. Reserpin hat allenfalls einen kleinen Effekt. Gelegentlich wird eine leichte Stimulation durch DBCA bzw. Glia-konditioniertes Medium beobachtet. Nur Glucocorticoide wie Dexamethason und Corticosteron erhöhen immer reproduzierbar den Opioidspiegel in den Hybridzellen 108CC15

und 108CC5, nicht dagegen in C6-BU-1-Gliomazellen. Maximale Stimulation findet man bei einer Dexamethasonkonzentration von 1 µM und einer Inkubationsdauer mit Dexamethason von 24 - 36 h. Es wird die Konzentration beider enkephalinähnlichen Opioide in den Hybridzellen erhöht. Der stimulatorische Glucocorticoideffekt auf den Enkephalingehalt in Hybridzellen ist entgegengesetzt dem inhibierenden Effekt auf die ß-Endorphin-Konzentration in Hypophysentumor-Zellen.

4.) Unter Depolarisationsbedingungen (56mM K^+, extrazellulär) nimmt der intrazelluläre Opioidgehalt leicht (15 - 30 %) ab. Im extrazellulären Medium wird jedoch wahrscheinlich wegen enzymatischen Abbaus keine Zunahme beobachtet. Auch aus DBCA behandelten Zellen werden durch Depolarisation keine erheblichen Opioidmengen freigesetzt. In Abwesenheit von Ca^{2+} steigt der intrazelluläre Opioidspiegel an.

5.) Das Dipeptid Kyotorphin (Tyr-Arg) erniedrigt die intrazelluläre Opioidkonzentration um etwa 40 %. Dieser Effekt ist Ca^{2+}-unabhängig.

6.) Kurzzeitige Inkubation von Hybridzellhomogenaten bei 37^{o} C (15 min) erhöht in zwei von drei Experimenten den Opioidgehalt. Zusatz des Antibiotikums Bacitracin zum Homogenat führt zu weiterer Steigerung (wahrscheinlich durch Hemmung des Abbaus). Puromycin hat im Hybridzellsystem nur schwache inhibitorische Wirkung auf den Enkephalinabbau.

IV. Vorläufige Untersuchungen über Nicht-Opioid-Faktoren aus Hybridzellen

Hybridzellextrakte enthalten verschiedene Faktoren, die die cyclo AMP-Konzentration in Hybrid- und Gliomazellen regulieren können (s. Kap. I. 1.3., S. 28). Diese Faktoren werden durch Gelchromatographie, zumindestens teilweise, voneinander getrennt. Sie unterscheiden sich deshalb wahrscheinlich in ihren Molekulargewichten. Versuche zur chemischen Charakterisierung der niedermolekularen Faktoren (Molekulargewicht $<$ 4000 dalton $\triangleq$ Ausschlußvolumen von Biogel P 4) sind in Kap. II. 1.3. beschrieben). Entsprechend Abb. 30 und Abb. 31 (S. 86 und S. 87) sind aber sowohl in Hybridzell- als auch in Gliomazell-Extrakten höhermolekulare Komponenten enthalten, die den hormonell bedingten Anstieg des cyclo AMP-Spiegels in beiden Zell-Linien unterdrücken können. ß-Endorphin ist die bisher einzige bekannte, höhermolekulare Stubstanz (MG. 3465), die in Hybridzellen einen solchen Effekt ausübt. Was die Gliomazellen betrifft, so gibt es bislang nur einen Faktor aus dem Serum, der den cyclo AMP-Gehalt erniedrigt. Die Existenz dieser Substanz ist von D. van Calker erstmals beschrieben worden (85). Es war nun interessant, die Natur der, möglicherweise neuen, höhermolekularen Faktoren aus Hybrid- und Gliomazellen zu untersuchen. Da noch unklar ist, ob es sich um einen Faktor oder mehrere Faktoren handelt, wird im folgenden vorsichtshalber von "Faktoren" die Rede sein.

IV. 1. Versuche zur Charakterisierung der höhermolekularen Faktoren aus Hybridzellen

IV. 1.1. Isolierung und Bestimmung der Aktivität

Wie gerade besprochen, eluieren die höhermolekularen Substanzen im Ausschlußvolumen einer Biogel P 4-Säule. Die Fraktionen werden vereinigt, lyophilisiert, wieder gelöst. Diese Lösung wird daraufhin getestet, wie stark der cyclo AMP-Spiegel abgesenkt wird (Abb. 57). In Hybridzellen wird der durch PGE_1 bedingte Anstieg des cyclo AMP-Spiegels nahezu vollständig unterdrückt (Kurve a). In C6-BU-1-Gliomazellen (Kurve b) wird die durch NA stimulierte cyclo AMP-Bildung deutlich weniger gehemmt. In Primärkulturen aus Gehirnen neugeborener Mäuse schließlich tritt keine Hemmung der durch Isoproterenol stimulierten cyclo AMP-Bildung auf (Kurve c). Da über den Wirkungsmechanismus dieser Faktoren noch nichts bekannt ist, kann auch nicht erklärt werden, warum mit verschiedenen Zellen unterschiedliche Aktivitäten gefunden werden.

Die Absenkung des intrazellulären cyclo AMP-Gehalts kommt nicht durch stimuliertes Ausfließen von cyclo AMP ins Medium zustande. In An- und Abwesenheit von Faktorlösung ist die Freisetzung von cyclo AMP ins Medium vernachlässigbar. Entweder wird also die Aktivität der Adenylatcyclase gehemmt oder die einer Phosphodiesterase stimuliert. Für erstere Möglichkeit spricht der Befund, daß im direkten Test der Hybridzelladenylatcyclase eine Hemmung der Akti-

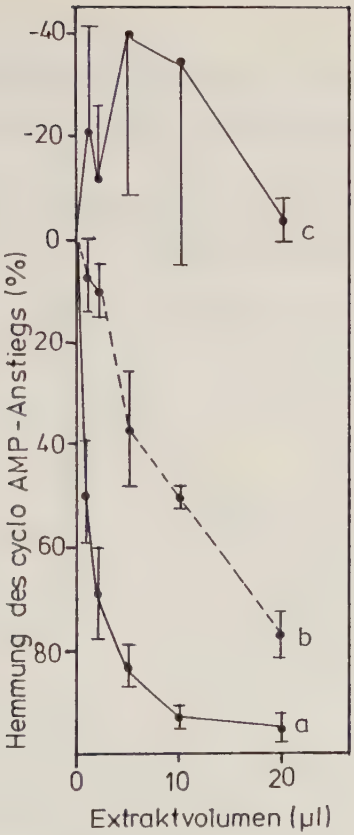


Abb. 57. Einfluß höhermolekularer Faktoren auf den cyclo AMP-Spiegel in verschiedenen Zellen.

a) 1.3×10^5 lebende Hybridzellen 108CC15 pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 86 %, P 17) maximaler cyclo AMP-Wert 1110 $\pm$ 70 pmol/mg Protein

b) 4.2×10^5 lebende Gliomazellen C6-BU-1 (Lebensfähigkeit 100 %, P 23), maximaler cyclo AMP-Wert 1980 $\pm$ 110 pmol/mg Protein.

c) Gehirnprimärkulturen neugeborener Mäuse (0.1 mg Protein pro Vertiefung), 2 Wochen alt, maximaler cyclo AMP-Wert 930 $\pm$ 120 pmol/mg Protein

Proteinkonzentration der Extraktlösung: 42.8 mg/ml (aus insgesamt ca. 12×10^8 Hybridzellen, P 15 - 17, 140 Petrischalen).

vität beobachtet wird (Tab. 25). Wenngleich, verglichen mit intakten Zellen (Abb. 57, Kurve a), die Hemmung viel

Tab. 25. Einfluß von höhermolekularen Faktoren aus Hybridzellen auf die Aktivität der Adenylatcyclase der Hybridzellen 108CC15.

PGE_1 (10 µM)	weiterer Zusatz	cyclo AMP (pmol.min^{-1}mg^{-1}Protein)
-	-	11.1 ± 0.3
+	-	100.9 ± 0.9
+	D-Ala-Met-Enkephalin (1µM)	74.8 ± 1.1
+	Faktorlösung (1 µl)	102.9 ± 2.0
+	Faktorlösung (2 µl)	98.6 ± 5.5
+	Faktorlösung (5 µl)	90.7 ± 0.5
+	Faktorlösung (10µl)	73.4 ± 1.5

Der Extrakt ist in Legende zu Abb. 57 beschrieben. Die Konzentrationen an Faktor im Test (mit 100 µl Endvolumen) sind auf Grund entsprechender Verdünnung identisch mit denen von Abb. 57. Der Adenylatcyclasetest wurde freundlicherweise von F. Propst durchgeführt.

schwächer ist, so scheint das testspezifisch zu sein. Durch die Homogenisation der Zellen werden möglicherweise viele Funktionen und Regulationsmechanismen gestört. Denn auch die Hemmung durch 1 µM D-Ala^2-Met-Enkephalin ist sehr viel geringer als in intakten Zellen. Zudem könnten aktive Komponenten aus den Extrakten im Homogenat proteolytisch inaktiviert werden.

Wenn durch die höhermolekularen Faktoren ausschließlich die Adenylatcyclase gehemmt wird, müßte in Gegenwart eines Phosphodiesterasehemmers (z.B. mit RO 20-1724) eine

Hemmung der Basalaktivität auftreten. Dies ist aber nach einer anfänglichen Stimulation erst bei höheren Faktorkonzentrationen der Fall (Abb. 58). Mehrere Erklärungsmöglichkeiten dieses Befundes sind denkbar:

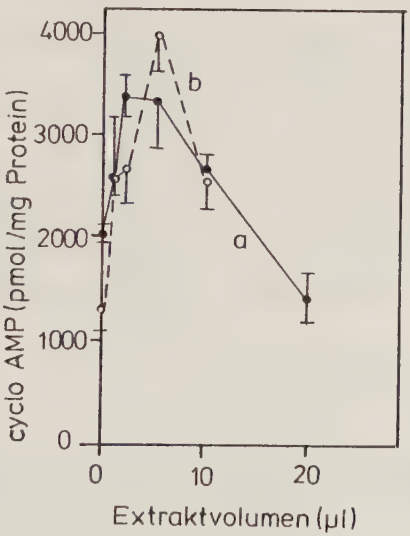


Abb. 58. Einfluß höhermolekularer Faktoren auf den cyclo AMP-Gehalt in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers RO 20-1724.

1.3 x 10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 77 %, P 21, Kurva a) bzw.
1.3 x 10^5 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 86 %, P 17, Kurve b).
Konzentration an RO 20-1724 : 0,3 mM

Der Extrakt wird in der Legende der Abb. 57 beschrieben. Kurven a und b stammen aus zwei Experimenten.

a.) In der Extraktlösung sind Faktoren enthalten, die trotz der Anwesenheit von RO 20-1724 andere Phosphodiesterasen hemmen. Diese Hemmung tritt bei niedrigen Konzentrationen

auf. Der cyclo AMP-Spiegel steigt an. Bei höheren Konzentrationen an Faktoren wird zusätzlich die Adenylatcyclase inhibiert. Der cyclo AMP-Gehalt fällt wieder. Es gibt gute Hinweise auf die Existenz mehrerer verschiedener Phosphodiesterasen in den Hybridzellen (87).

b.) In der Extraktlösung sind Komponenten enthalten, die den cyclo AMP-Spiegel erhöhen,und solche, die ihn erniedrigen, möglicherweise in verschiedenen Konzentrationen. Bei höheren Konzentrationen sind die hemmenden Komponenten wirksamer. Gleiches wird bei der Kombination von stimulierenden und hemmenden Hormonen in Hybridzellen immer beobachtet. Das hemmende Hormon setzt sich durch. Weitere Reinigung der Extrakte wird zur Klärung dieses Problems beitragen.

Zur Untersuchung des zweiten möglichen Wirkungsmechanismus der Faktoren, der Aktivierung einer Phosphodiesterase, wurden noch keine Versuche durchgeführt. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings der folgende Befund: Die Hemmung des hormonell bedingten cyclo AMP-Anstiegs ist, zumindestens teilweise, reversibel (Tab. 26). Die Phosphodiesterasen sind intrazellulär lokalisiert. Ein potentieller, sehr aktiver Inhibitor müßte also innerhalb von 10 min (während der Hauptinkubation) wieder aus der Zelle verschwinden. Dies ist unwahrscheinlich. Nach Vorinkubation mit Faktorlösung wird nicht mehr ganz der cyclo AMP-Spiegel des Kontrollwerts erreicht. Dies mag daran liegen, daß durch ein-

Tab. 26. Reversibilität der Wirkung der höhermolekularen Faktoren auf den cyclo AMP-Spiegel

Zusätze		cyclo AMP
Vorinkubation	Hauptinkubation	(pmol/mg Protein)
-	-	47 ± 12
-	PGE_1 (0.3 µM)	1270 ± 158
-	PGE_1 + 10 µl Faktorlösung	510 ± 76
-	PGE_1 + 20 µl Faktorlösung	135 ± 52
10 µl Faktorlösung	PGE_1	951 ± 265
20 µl Faktorlösung	PGE_1	567 ± 45
10 µl Faktorlösung	PGE_1 + 10 µl Faktorlösung	352 ± 68
20 µl Faktorlösung	PGE_1 + 20 µl Faktorlösung	90 ± 27

1.4×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 93 %, P 16).
Die Extrakt-Lösung ist eine Mischung verschiedener Extrakte (aus Zellen P 17 - 21, 303 Petrischalen). Die Proteinkonzentration ist 22.9 mg/ml.
Vor- und Hauptinkubation dauerten je 10 min. Dazwischen wurde 1 x mit 0.5 ml Medium gewaschen.

maliges Waschen während der Inkubationen die Faktoren nicht vollständig entfernt werden. Dafür spricht, daß bei Anwesenheit von Faktorlösung in Vor- und Hauptinkubation eine stärkere Hemmung beobachtet wird.

Ergänzend sei angefügt, daß in gleicher Weise gewonnene und gereinigte Extrakte aus C 6-Gliomazellen ebenfalls in Hybridzellen die cyclo AMP-Bildung inhibieren. Auf Glioma-

zellen sind sie, wie die Hybridzellextrakte, weniger aktiv. Es bleibt zu zeigen, ob die Faktoren aus beiden Zell-Linien identisch sind.

IV. 1.2. Verschiedene Antagonisten beeinflussen die Wirkung der höhermolekularen Faktoren nicht

Wie bereits erwähnt, kann der cyclo AMP-Gehalt der Hybridzellen über vier, bislang bekannte, verschiedene Rezeptoren erniedrigt werden. Das sind die Rezeptoren für AcCh, NA, Opioide und Somatostatin. Wenn die höhermolekularen Faktoren über einen dieser Rezeptoren wirken, müßte in Gegenwart entsprechender Antagonisten die Aktivität geschmälert sein. Dies ist, wie Abb. 59 zeigt, nicht der Fall. Für Somatostatin ist noch kein Antagonist bekannt. Weder Phentolamin, ein α -adrenerger Antagonist, noch Atropin, ein muscarinisch-cholinerger Antagonist, noch der Opioidantagonist Naloxon verschieben die Dosis-Wirkungskurve. Die höhermolekularen Faktoren wirken also entweder über andere Rezeptoren oder über einen Mechanismus ohne Beteiligung von Rezeptoren.

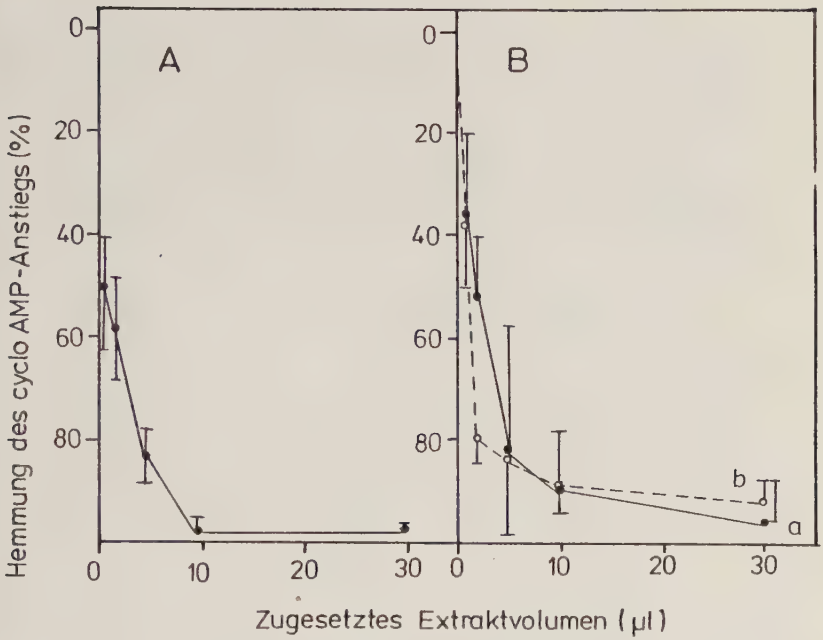


Abb. 59. Einfluß von Antagonisten auf die Wirksamkeit der höhermolekularen Faktoren.

1.0 x 10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 88 %, P 16); maximaler cyclo AMP-Wert 228 ± 40 pmol/mg Protein. Proteinkonzentration der Extraktlösung (aus ca. 6.3 x 10^8 Hybridzellen, P 20, 69 Petrischalen) 35 mg/ml.

A: Kontrolle; B: in Gegenwart von 10 µM Phentolamin + 1 µM Atropin (Kurve a) oder 10 µ Naloxon (Kurve b). Kontrollinkubationen sind (cyclo AMP (pmol/mg Protein)): PGE_1 + Naloxon 380 ± 83; PGE_1 + Leu-Enkephalin (10 µM) 121 ± 24; PGE_1 + Leu-Enkephalin + Naloxon 270 ± 35; PGE_1 + Phentolamin + Atropin 258 ± 16; PGE_1 + Noradrenalin (0.1 µM) 58 ± 7; PGE_1 + AcCh (1 µM) 81 ± 5; PGE_1 + Phentolamin + Atropin + Noradrenalin 228 ± 7; PGE_1 + Phentolamin + Atropin + AcCh 383 ± 130.

IV. 1.3. Chemische Natur und Stabilität der höhermolekularen Faktoren

Extrakte, die durch Behandlung der Zellen mit AcOH hergestellt werden, sind bezüglich der höhermolekularen Faktoren sehr aktiv. Solche, die mit TCA erhalten werden, dagegen gänzlich inaktiv. Abb. 60 soll dies veranschaulichen.

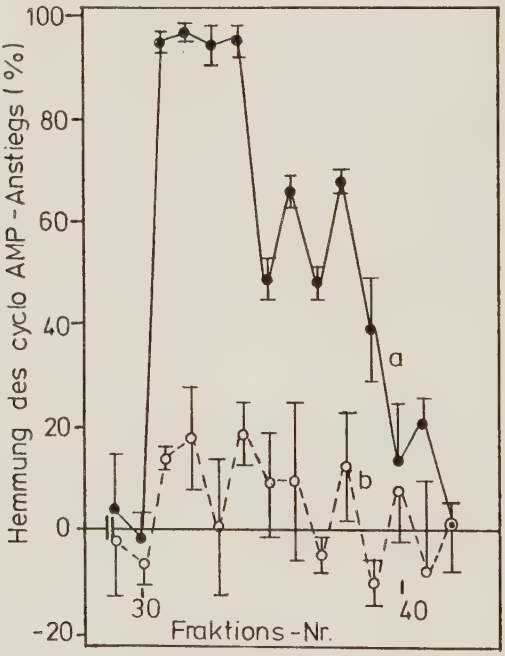


Abb. 60. Vergleich der Aktivität verschieden hergestellter Extrakte.

a: Extraktion mit 1 M AcOH, b: Extraktion mit 8 % TCA.

1.2 x 10^5 lebende Hybridzellen 108CC15 (Lebensfähigkeit 94 %, P 19; maximaler cyclo AMP-Wert 669 $\pm$ 5 pmol/mg Protein.

Die Extrakte (aus je ca. 4.1 x 10^8 Zellen, P 15, 20 Petrischalen) sind über Biogel P 4 gereinigt. Endvolumen der Fraktionen: 150 µl; 30 µl in den Test eingesetzt.

Aus Kurve a (1 M AcOH) kann man auf die Anwesenheit von mindestens drei Faktoren schließen. Das Fraktionsmuster ist vollkommen reproduzierbar und wird auch in Extrakten aus C6-BU-1-Gliomazellen gefunden. Im TCA-Extrakt (Kurve b) ist, wenn überhaupt, nur sehr schwache Hemmaktivität feststellbar. Die aktiven Komponenten aus Hybrid- und Gliomazellen werden also durch TCA ausgefällt. Dies ist für die meisten Proteine der Fall. Aus diesem Ergebnis kann aber nicht auf die Proteinnatur der höhermolekularen Faktoren geschlossen werden. Der schon erwähnte Serumfaktor (85), der die cyclo AMP-Bildung in Gliomazellen hemmt, wird ebenfalls durch TCA-Behandlung inaktiviert (220). Trotzdem handelt es sich bei diesem Faktor aller Wahrscheinlichkeit nicht um ein Protein, sondern um lipidähnliche Substanzen (220). Diese sind aber nur in Gegenwart bestimmter Proteine voll aktiv. Proteineigenschaften wie TCA-Fällbarkeit, Nichtdialysierbarkeit, hohes Molekulargewicht (aus Gelfiltrationsversuchen) werden so vorgetäuscht.

Es besteht die Möglichkeit, daß bei Extraktion mittels TCA die Faktoren auf Grund von Adsorption an andere Proteine durch diese mitpräzipitiert werden und deshalb nicht extrahierbar sind. Daher wurde eine über Biogel P 4 gereinigte Extraktlösung mit TCA behandelt und ein Parallelansatz außerdem dialysiert (Abb. 61). Gegenüber der Kontrolle (Kurve a) sinkt nach Dialyse die Aktivität etwas ab (Kurve b). Auffällig ist, daß nach Dialyse bei etwa 65%iger

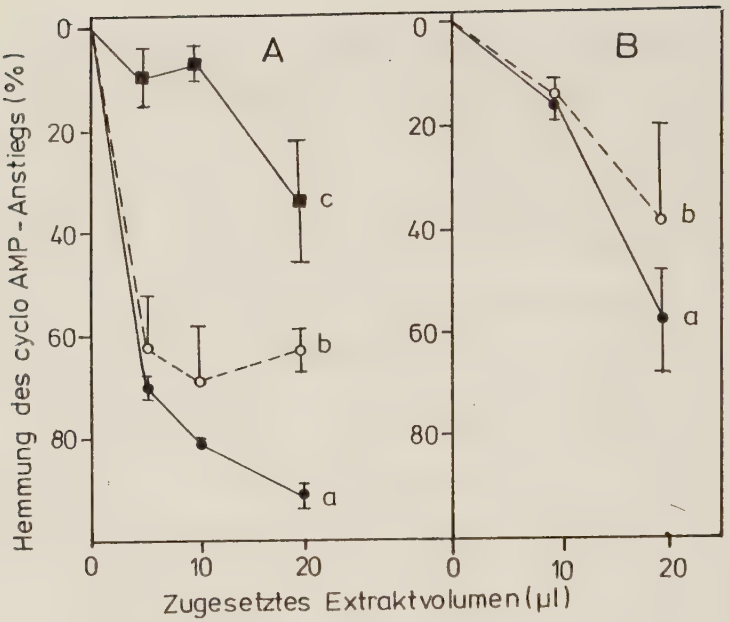


Abb. 61. Aktivität einer Extraktlösung nach Dialyse und Behandlung mit TCA.

1.5×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 95 %, P 17); maximaler cyclo AMP-Wert 677 $\pm$ 3 pmol/mg Protein.
Die Proteinkonzentration der Extraktlösung (aus ca. 7.6×10^8 Zellen, P 22, 150 Petrischalen) betrug 29.2 mg/ml.

A: Kontrolle (Kurve a), nach Dialyse (Kurve b), nach TCA-Behandlung (Kurve c).

B: Dialyse nach TCA-Behandlung (Kurve a), TCA-Behandlung nach Dialyse (Kurve b).

Dialyse jeweils 24 h bei 4° C gegen 1000 ml 0.05 M Tris·HCl pH 7.4 (25° C). TCA-Fällung mit 10 % TCA.

Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs ein Plateau erreicht wird. Dies ist reproduzierbar. Möglicherweise wird eine Komponente verloren oder inaktiviert. Ein ähnliches Phänomen

tritt bei Dialyse des Faktors auf, der im Gliomazell-konditioniertem Medium enthalten ist und in Hybrid-Hybrid-Zellen die Cholinacetyltransferase-Aktivität steigert (204). Nach TCA-Behandlung der Extraktlösung bleibt noch eine geringe Aktivität im Überstand (Abb. 61, A, Kurve c). Diese Komponente ist aber nicht identisch mit der, die eventuell bei der Dialyse verloren geht. Denn sowohl Dialyse des Überstandes der TCA-Fällung (Abb. 61 B, Kurve a), wie auch TCA-Fällung des Extraktes nach Dialyse ergeben Kurven, die sich von der Kurve c (Abb. 61 A), TCA-Fällung allein nicht signifikant unterscheiden. Der TCA-resistente Faktor ist also nicht dialysierbar.

Um zu sehen, ob diese Faktoren Proteine sind, wurden Extrakte mit Proteasen behandelt. Abb. 62 zeigt den Einfluß von Trypsin und Pepsin auf die biologische Wirksamkeit. Bei kurzzeitiger Einwirkung (30 min) wird sowohl durch Pepsin (A) und Trypsin (B) die Aktivität nur wenig, aber signifikant verringert. Pepsin ist dabei eine etwas aktivere Protease. Bei längerer Behandlung (16 h) mit Pepsin wird die Aktivität vollkommen zerstört (C). Da die Kontrollwerte ohne Enzym in gleicher Weise behandelt wurden, ist der Aktivitätsverlust durch Pepsin verursacht worden. Die höhermolekularen Faktoren aus Hybridzellen sind also sehr wahrscheinlich Proteine.

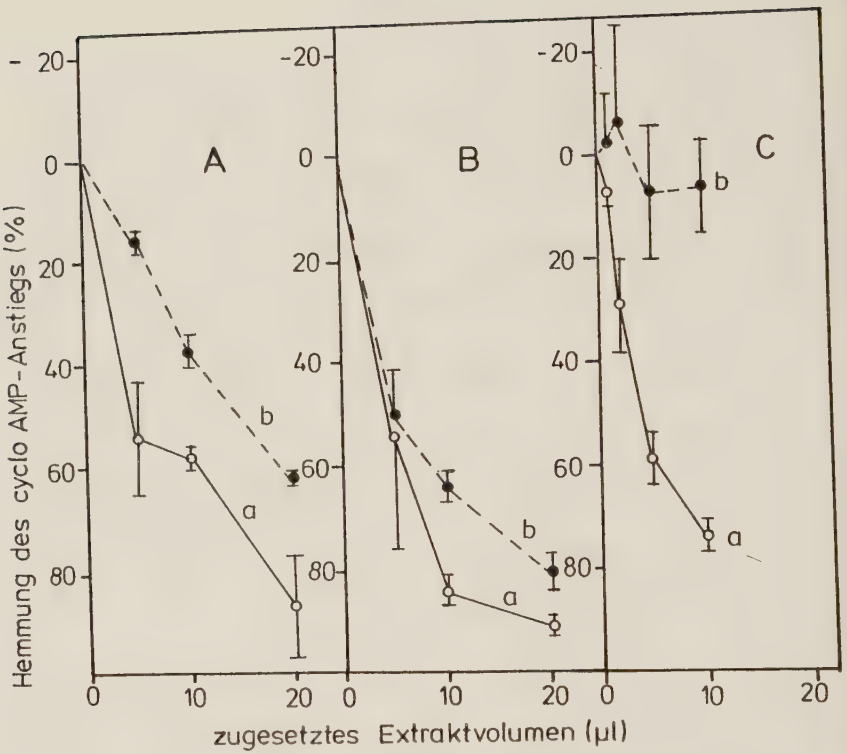


Abb. 62. Einfluß von Proteasen und der Dauer der Behandlung auf die Wirksamkeit der höhermolekularen Faktoren.

Die Kurven in C entstammen einem anderen Experiment (mit unterschiedlichem Extrakt).

1.4×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 93 %, P 16, A, B); maximaler cyclo AMP-Wert 1370 $\pm$ 240 pmol/mg Protein.

Der Extrakt ist in der Legende zu Tab. 26 beschrieben.

A: Behandlung ohne (Kurve a) und mit (Kurve b) Pepsin für 30 min bei 37°C, pH 2.0.

B: Behandlung ohne (Kurve a) und mit (Kurve b) Trypsin für 30 min bei 37°C pH 7.4.

C: 1.3×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 77 %, P 21); maximaler cyclo AMP-Wert 942 $\pm$ 46 pmol/mg Protein. Proteinkonzentration des Extraktes 33.1 mg/ml (aus Zellen P 15-17) Behandlung ohne (Kurve a) und mit (Kurve b) Pepsin für 16 h bei 37°C, pH 2.0.

Die Hybridzellen werden in Gegenwart von FCS kultiviert. Es besteht also die Möglichkeit, daß die Zellen daraus den schon erwähnten Serumfaktor aufnehmen oder an ihre Oberfläche binden. Die höhermolekularen Faktoren aus Hybridzellen könnten theoretisch also mit dem Serumfaktor identisch sein. Der Serumfaktor wird aber im ungereinigten Zustand durch Behandlung mit Proteasen nicht inaktiviert (220). Deshalb ist er wahrscheinlich verschieden von den Hybridzellfaktoren. Wenn aber in angereicherten Fraktionen des Serumfaktors alles enthaltene Protein vollständig verdaut wird, verliert auch der wahrscheinlich an Protein adsorbierte Faktor ca. 90% seiner Wirkung (220). Zusatz von Protein bringt die Wirksamkeit zurück (220). Ob Ähnliches auch für die Hybridzellfaktoren gilt, muß erst noch untersucht werden.

Sehr viele Proteine werden durch Hitzebehandlung denaturiert, nicht jedoch die höhermolekularen Faktoren aus Hybridzellen (Abb. 63). Auch 20-minütiges Stehenlassen in kochendem Wasser verringert die biologische Aktivität nicht. Die Proteinkonzentration in der Extraktlösung ist nach der Inkubation zu allen Zeiten gleich. Einige sehr hitzestabile Proteine sind bekannt. Ein Beispiel ist die Phospholipase A_2 (221). Behandlung von Rattenlebermembranen mit Phospholipase A_2 führt zur Hemmung der Adenylatcyclaseaktivität (222). Es wurde noch nicht untersucht, ob in den Zellextrakten eine Phospholipase A_2 vorhanden ist, die für die Absenkung des cyclo AMP-Spiegels verantwortlich ist.

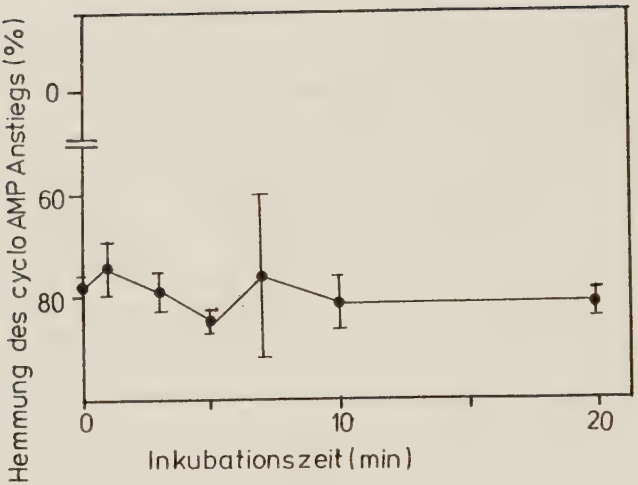


Abb. 63. Wirksamkeit der Hybridzellfaktoren nach verschieden langer Hitzebehandlung.

2.0×10^5 lebende Zellen (Lebensfähigkeit 93 %, P 20); maximaler cyclo AMP-Wert 2780 ± 200 pmol/mg Protein.
Der Extrakt ist in der Legende zu Tab. 26 beschrieben.

100 µl dieser Lösung (in 0.05M Tris·HCL, pH 7.4 (25/°C)), wurden für die angegebene Zeit in einem kochenden H_2O-Bad belassen, 20 µl davon dann in den Test eingesetzt.

IV. 1.4. Weitere Reinigung der höhermolekularen Faktoren durch Gel- und Ionenaustauschchromatographie

Alle Proteine und Peptide mit einem Molekulargewicht > 4000 eluieren im Ausschlußvolumen einer Biogel P 4-Säule. Zur weiteren Auftrennung dieser Ausschlußfraktion durch Gelchromatographie wurde Sephadex G-75 verwendet. Ein typisches UV-Extinktionsdiagramm ist in Abb. 64 gezeigt.

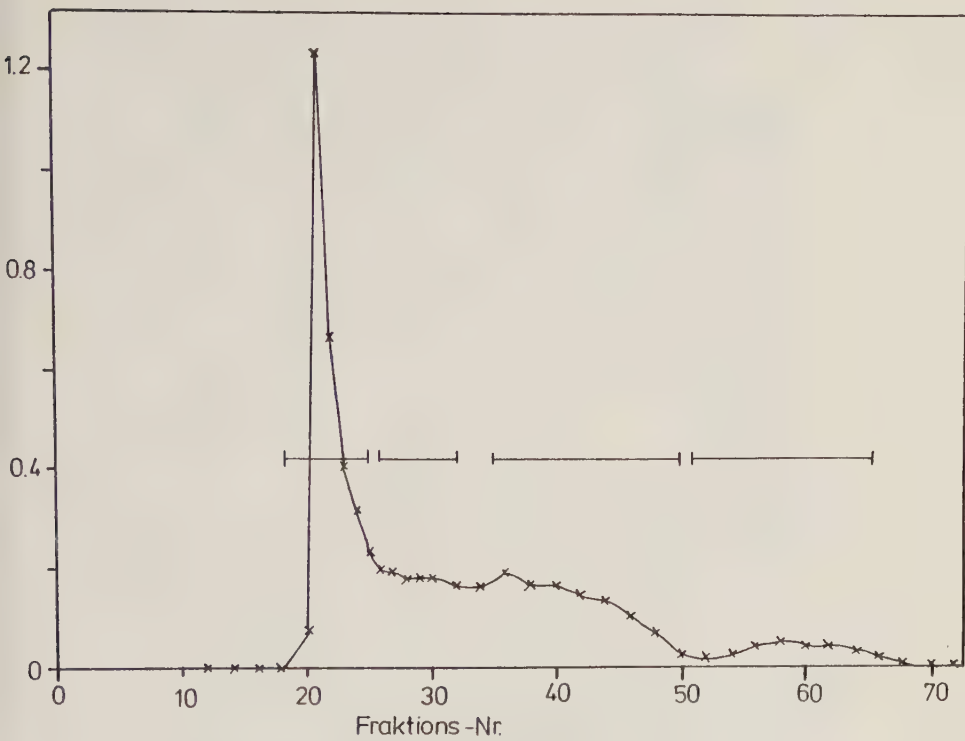


Abb. 64. UV-Extinktionsdiagramm eines Hybridzellextraktes nach Chromatographie an Sephadex G-75.
Auftrag 9.9 mg Protein (aus Zellen P15 - P17).
Säule: 95 x 1 cm, Fluß: 5.5 ml/h;
Elutionspuffer: 0.05 M NH_4 AcO, pH 6.5.

Die Fraktionen wurden entsprechend den Balken in Abb. 64 vereinigt und auf ihre biologische Aktivität getestet (Abb. 65). Die meiste Aktivität eluiert in den Fraktionen 18 - 25, was gleichzeitig dem Ausschlußvolumen der Säule entspricht. 55 % des wiedergefundenen Proteins (77 %) sind darin enthalten. Diese Fraktionen sind sowohl auf Hybridzellen (A) als auch auf Gliomazellen (B) aktiv. Wie

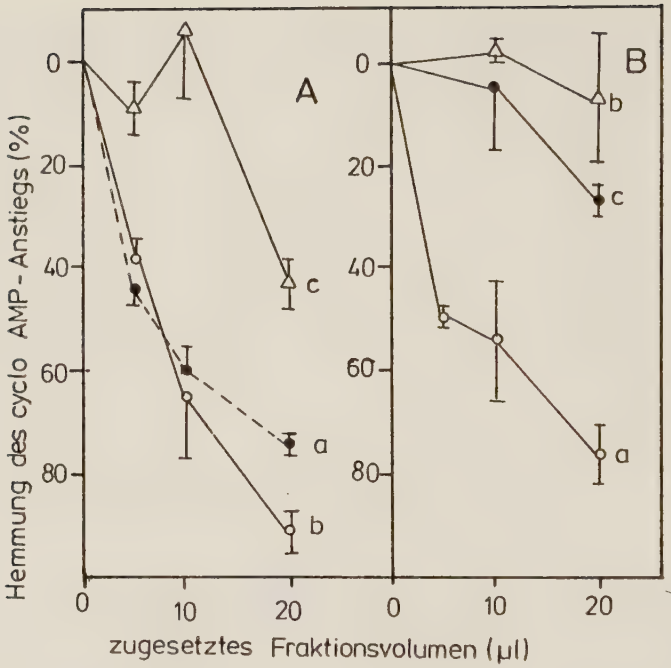


Abb. 65. Aktivität nach Chromatographie eines Hybridzell-Extraktes an Sephadex G-75, in Hybrid- (A) und Glioma-Zellen (B).

A: 0.8×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 90 %, P 16); maximaler cyclo AMP-Wert 838 ± 145 pmol/mg Protein.
a: Extrakt vor Chromatographie, b: Fraktionen 18 - 25; c: Fraktionen 26 - 32.

B: 9.0×10^5 lebende Gliomazellen (Lebensfähigkeit 99 %, P 27); maximaler cyclo AMP-Wert 2480 ± 100 pmol/mg Protein.
a: Fraktionen 18 - 25; b: Fraktionen 26 - 32; c: Fraktionen 51 - 65.

Auftrag: 9.9 mg Protein (Extrakt wie in Abb. 63). Endvolumen der Fraktionen 200 µl. Säule und Elutionsbedingungen wie in Legende zu Abb. 64 beschrieben. Der cyclo AMP-Spiegel wurde bei Hybridzellen durch 0.3 µM PGE_1, bei Gliomazellen durch 100 µM NA erhöht.

schon früher gezeigt (Abb. 57) ist die Aktivität der Faktoren auf Gliazellen auch hier geringer. Die Aktivität der Fraktionen 26 - 32 beruht wahrscheinlich auf restlichen Anteilen der vorhergehenden Fraktion. In den Fraktionen 35 - 50 und 51 - 65 wird auf Hybridzellen keinerlei Hemmaktivität gefunden (Der Übersicht halber sind die Kurven deshalb weggelassen). Fraktionen 35 - 50 sind auch auf Gliomazellen inaktiv, Fraktionen 51 - 65 (Abb. 65 B, Kurve c) erniedrigen aber geringfügig den cyclo AMP-Spiegel.

Die Hemmung des cyclo AMP-Anstiegs in Hybrid- und Gliomazellen wird also eventuell durch denselben Faktor bewirkt (in Fraktionen 18 - 25). Es überrascht, daß ein hitzestabiles Protein im Ausschlußvolumen (Molekulargewicht $>$ 70 000) einer Sephadex G-75-Säule eluiert. Möglicherweise bilden die Proteine stabile Aggregate mit anderen Proteinen. Versuche mit präparativer und SDS-Gelelektrophorese sollen helfen, diese Frage zu beantworten. Vorversuche zeigten eine starke Bande sowie zwei oder drei sehr schwache Banden in einem nativen Polyacrylamidgel. In einem SDS-Plattengel dagegen sind drei starke und viele schwache Banden zu erkennen. In den Fraktionen 18 - 25 der G-75-Säulenfraktionierung sind ebenfalls noch alle Banden enthalten. Das könnte für eine Aggregation einiger Proteine sprechen.

Alternativ wurde ein Hybridzell-Extrakt an einer DEAE-Anionenaustauschersäule chromatographiert. Vereinigte Frak-

tionen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, den Anstieg des cyclo AMP-Spiegels in Hybridzellen zu verhindern (Abb. 66). Der überwiegende Teil der Aktivität bindet nicht an die Säule und ist in der Startpufferfraktion 5 - 25 (Kurve b) enthalten. Das entspricht 78 % des wiedergefundenen Proteins (92 %). Gegenüber dem ungereinigten Extrakt (Kurve a) scheint eine Anreicherung stattgefunden zu haben. Weitere signifikante Hemmaktivität wird in den Fraktionen 55 - 75, 76 - 92 und 93 - 110 gefunden. Werden die Fraktionen auch auf C6-BU-1 Gliomazellen getestet, sind wiederum die Fraktionen 5 - 25 die aktivsten, wenn auch etwas weniger als auf Hybridzellen. Auch die Fraktionen 76 - 92 und 93 - 110 sind auf Gliomazellen ähnlich wirksam wie auf den Hybridzellen. Das deutet daraufhin, daß in den Extraktlösungen mehrere aktive Komponenten enthalten sind, die auf beide Zelltypen einwirken. Die aktivste Komponente könnte also ein basisches Protein sein, dessen isoelektrischer Punkt über pH 7.5 liegt. In einer analytischen isoelektrischen Fokussierung tritt eine starke Bande etwa bei pH 9 auf. Es konnte noch nicht untersucht werden, ob diese Bande der aktiven, basischen Komponente entspricht. Die Tatsache, daß die gesamte Aktivität nach der DEAE-Säulenchromatographie wiedergefunden wird, bedeutet einen weiteren Unterschied gegenüber dem Serumfaktor; denn dieser wird nach Adsorption an DEAE-Cellulose nicht mehr gefunden (220). Gerade das umgekehrte Ergebnis ergibt sich bei Chromatographie an Carboxymethylcellulose bzw. Carboxymethylsephadex. Der Serum-

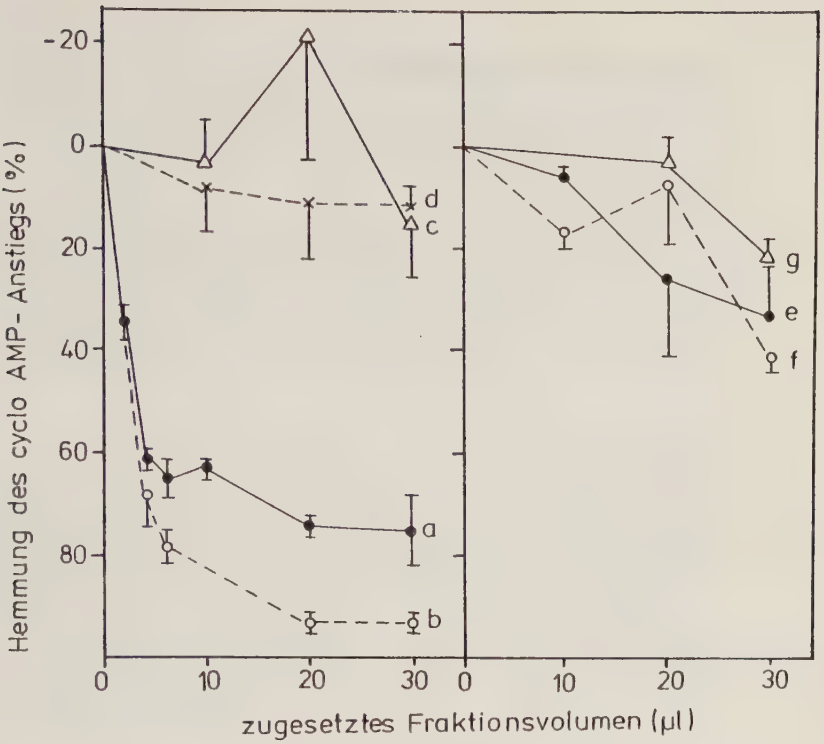


Abb. 66. Aktivität nach Chromatographie eines Extraktes an einer DEAE-Anionenaustauschersäule.

1.5×10^5 lebende Hybridzellen pro Vertiefung (Lebensfähigkeit 95 %, P 15); maximaler cyclo AMP-Wert 1130 ± 210 pmol/mg Protein.
Säule: 21 x 2 cm, Flußgeschwindigkeit: 23 ml/h.
Startpuffer: 0.05 M NH_4AcO, pH 7.5, 100 ml ≙ 24 Fraktionen. Anschließend linearer Gradient von 0.05 M zu 0.5 M NH_4AcO, pH 7.5 in 13 h.
Auftrag: 23.7 mg Protein (aus Zellen P 19 - 21).
Kurven: a: vor Chromatographie; b: Fraktionen 5-25; c: 26-37; d: 38-54; e: 55-75; f: 76-92; g: 93-110.
Endvolumen der Fraktionen: 600 µl.

faktor wird vollständig im Durchlauf gefunden (220), von einer Faktorlösung aus Hybridzellen geht nahezu die gesamte Aktivität verloren (Elutionsbedingungen: NH_4AcO, pH 6.0, linearer Gradient 0.05 M bis 0.5 M in 15 Std.). Nur 38 % des aufgetragenen Proteins sind im Eluat enthalten. Die Faktoren aus Hybridzellen scheinen fest an den Kationenaustauscher zu binden. Dieser Befund spricht wiederum für ein sehr basisches Protein.

IV. 2. Zusammenfassung

1.) Aus Hybrid- und Gliomazellen können höhermolekulare Faktoren extrahiert werden, die in beiden Zell-Linien die hormonell stimulierte cyclo AMP-Bildung hemmen. In hauptsächlich aus Astroblasten bestehenden Mäusegehirn-Primärkulturen dagegen hemmen diese Faktoren nicht. Es gibt gute Hinweise dafür, daß die Hemmung des Anstiegs des cyclo AMP-Spiegels durch eine Erniedrigung der Adenylatcyclaseaktivität zustande kommt:

a) Im direkten Adenylatcyclasetest wird eine Aktivitätsminderung durch die Zugabe der Faktoren beobachtet.

b) Die Wirkung der höhermolekularen Faktoren ist zumindestens teilweise reversibel. Das spricht für einen Angriffspunkt an der Zelloberfläche. Eine denkbare Aktivierung einer Phosphodiesterase ist unwahrscheinlich.

2.) In Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers RO 20-1724 wird bei niedrigen Faktorkonzentrationen der cyclo AMP-

Gehalt vergrößert, bei höheren Konzentrationen wieder erniedrigt. Mehrere gegensätzlich wirkende Komponenten sind möglicherweise in den Extrakten enthalten.

3.) Die höhermolekularen Faktoren wirken auf Hybridzellen nicht über die Rezeptoren für AcCh, NA oder die Opioide. Entsprechende Antagonisten beeinflussen die Wirksamkeit nämlich nicht.

4.) Die Faktoren werden durch AcOH aus den Zellen extrahiert, nicht aber durch TCA. TCA fällt aus einer Faktorlösung nahezu die gesamte(n) aktive(n) Komponente(n) aus. Eine kleine Restaktivität ist nicht dialysierbar. Bei Dialyse der Extraktlösung geht ein kleiner Teil der Aktivität verloren. Diese ist nicht identisch mit der TCA-resistenten Aktivität.

5.) Kurzzeitige Behandlung mit Proteasen (Pepsin, Trypsin) inaktiviert die Faktoren nur geringfügig. Bei 16-stündiger Verdauung mit Pepsin werden die aktiven Komponenten aber völlig zerstört. Es handelt sich also sehr wahrscheinlich um Proteine. Trotzdem sind die aktiven Komponenten sehr hitzestabil. 20-minütige Inkubation in kochendem Wasser mindert die Wirksamkeit nicht.

6.) Nach Chromatographie an Sephadex G-75 eluieren die aktiven Komponenten im Ausschlußvolumen. Das Molekulargewicht der Faktoren ist also $>$ 70 000, falls nicht

Aggregate mit anderen Proteinen ein hohes Molekulargewicht vortäuschen. Die Ausschlußfraktionen sind sowohl auf Hybrid- wie auf Gliomazellen aktiv. Dieselben Faktoren wirken also möglicherweise auf beide Zelltypen ein. Das wird durch Chromatographie-Experimente an DEAE-Anionenaustauschersäulen unterstützt. Die aktivsten Komponenten werden nicht von der Säule adsorbiert. Sie eluieren mit dem Startpuffer und sind auf Hybrid- und Gliomazellen aktiv. Bei höherer Ionenstärke eluieren viel schwächer aktive Substanzen. Ausführliche Studien sind notwendig, um die Faktoren weiter zu charakterisieren, zu identifizieren und ihre physiologische Wirksamkeit zu erkennen.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Verwendete Geräte, Materialien und Reagentien

I.1. Geräte

Tricarb, Liquid Scintillation Spectrometer 3385 und 2660, Packard, Frankfurt

Dünnschichtscanner LB 2723, Berthold, Wildbad

Spektralphotometer PM 6, Zeiss, Oberkochen

Zentrifugen Potosilenta F und Tischzentrifuge Mikroliter, Hettich, Tuttlingen

Kühlzentrifuge Sorvall RC-2B und RC-5B mit Rotor SS34, Du Pont, Bad Nauheim

Fraktionskollektoren 7000 Ultrorac und Ultro Rac III, LKB, Gräfelfing

UV-Monitor Uvicord S mit 1- und 2-Kanal-Flachbett-schreiber, LKB, Gräfelfing

UV-Monitor Isco UA-5, Colora, Lorch

Schlauchpumpen Varioperpex und Multiperpex, LKB, Gräfelfing

Leitfähigkeitsmeßgerät MH-2 Digital, Cornig, Bachofer, Reutlingen

Ultraschall-Desintegrator, Ultraschallgenerator mit Mikrospritze von KLN, Heppenheim

Speed vac Concentrator mit Rotoren Typ 1275 und 4015, Bachofer, Reutlingen

HPLC-Anlage (Constametric I + II, Gradient Master, Spectromonitor III), Latek, Heidelberg

Rotationsverdampfer PCR 500, Genser, Rothenburg o. T.

Wasserbäder: Haake FS 2 bzw. Thermomix 1440, Braun, Melsungen

Kryostat, Colora, Lorch

Mixer, Vortex Genie Mix, Bachofer, Reutlingen

Filtrationsgerät SM 16315, Sartorius, Göttingen, und Pyrex-Ganzglas-Filtrationsgerät 47 mm, Millipore, Neu-Isenburg

pH-Meter: Modell 3500, Beckman, München, und Knick 643, Bachofer, Reutlingen

Osmometer Halbmicro Digital, Knauer, Oberursel

Brutschränke Heraeus Typ B 5060 EK CO_2, Heraeus, Hanau und Forma CO_2-Inkubator, Labotect, Göttingen

Trockenschrank, Memmert, Schwabach

Hochspannungselektrophoreseanlage: Netzgerät, Hölzel, Dorfen; Tanks LT 48 A, Savant Instruments, Hicksville, N. Y. (USA)

Fluoreszenzmikroskop SM-Lux, Leitz, Wetzlar

Waagen: 2001 MP2, 1264 MP und 1205 M, Sartorius, Göttingen; M5, Mettler, Gießen

Ölpumpen: Drehschieberölpumpe Typ 317, Dürr-Dental, Bietigheim und Trivac Hochvakuumpumpe, Leybold-Heraeus, Köln

Motor für Homogenisator RW-42 und Magnetrührer, Janke und Kunkel, Ika Werk, Staufen im Breisgau

Potter-Elvehjem-Homogenisator, Thomas, Philadelphia (USA)

UV-Lampe, Fluotest, Hanau

Gefriertrockner LO5, WKF, Modautal

Gradientenmischer, elektronisch, Gilson, Abimed, Düsseldorf, und einfaches Mischgefäß, Eigenbau MPI für Biochemie, Martinsried

Mikroliterpipetten (verstellbar): Finnpipetten, Pipetman, Transferpettor,

Mikrolitherspritzen Hamilton, Fa. Schmid, Hamburg, und Kloehn, Latek,Heidelberg

Chromatographie-Säulen mit Zubehör: Eigenbau des MPI für Biochemie, Martinsried

Quickfit Apparatur von Jobling Laboratory Division, Stone, Staffordshire, England

6-fach-Absauganlage für Multigewebekulturplatten,Eigenbau, MPI für Biochemie, Martinsried

Die verwendeten Geräte für die Zellkultur sind in (78) beschrieben.

I. 2. Materialien

Säulenfüllmaterialien: Sephadex G-75, LH-20, CM-Sephadex C 50 von Pharmacia, Freiburg; Biogel P-4, 200-400 mesh, Bio-beads SM-2, 20-50 mesh, AG 1-X 8 Cl^--Form, 100-200 mesh, von Biorad, München; Whatman DE-52 von Hermle, St. Leon-Rot

Filter: Whatman GF/B und GF/C von Hermle, St. Leon-Rot; Cellulosenitratfilterbögen BA 85/1 (330 x 560 mm) 0.45 µm Porenweite, Schleicher und Schüll, Dassel; Filter: 0.45 µm Porenweite, 47 mm Durchmesser von Sartorius, Göttingen

Papier für die Elektrophorese, Whatman 3MM und 1

Dünnschichtplatten Kieselgel 60F-254 Merck, Darmstadt

Micropolyamidfolien F-1700 und A-1700, Schleicher und Schüll, Dassel

HPLC-Säulen: 10 µm-RP-18, 250 mm x 4.6 mm und 10 µm RP18-Vorsäule 40 x 4.6 mm von Knauer, Oberursel; 5 µm RP-18, 250 mm x 4.6 mm von Latek, Heidelberg

Dialyseschlauch von Serva, Heidelberg

Varsol (Testbenzin 145/200) von Clericus, Ziehl & Co., Nürnberg

Ultrofilm ^3H für die Autoradiographie von LKB, Gräfelfing

Plastikwaren für die Zellkultur von Nunc, Wiesbaden; Greiner, Nürtingen; Falcon Plastics und Lux Plastics über LS-Laborservice, München

Wheaton Glas Scintillationsfläschchen, Zinsser, Frankfurt; Miniszintillationsfläschchen Pico-vials aus Plastik, Packard, Frankfurt

Mikroliter-Kapillaren 1/ul, 2/ul, 5/ul, Assistent, über lokalen Laborhandel

Wasser, Methanol, Essigsäure für die HPLC von Baker, Gross-Gerau

Acetonitril und Chloroform für die Spektroskopie, Propanol-1 für die Chromatographie, NH_3 (25 %) Suprapur von Merck, Darmstadt

Enhance-Spray ^3H für die Autoradiographie von New England Nuclear, Dreieich

Für alle gewöhnlichen, wäßrigen Lösungen wurde Wasser aus einer Nanopure-Anlage D-1799 von Barnstaed, Fa. Werner, Köln, verwendet.

I. 3. Reagentien

Nicht eigens aufgeführte Reagentien sind entweder anderswo (78) beschrieben oder stammen von Merck, Darmstadt. Sie besaßen den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad. Ein nachgestelltes (G) zeigt an, daß die betreffende Sub-

stanz als Geschenk erhalten wurde. Den betreffenden Personen und Firmen sei dafür herzlich gedankt.

Enzyme: Trypsin, Dispase, Leucin-Aminopeptidase, Pepsin Carboxypeptidase A, Acetylcholinesterase, Papain, Proteinase K, Chymotrypsin, Hyaluronidase von Boehringer, Mannheim. Deoxyribonuclease I (1322 Kunitz units per mg Protein) von Sigma München.
Pronase von Serva, Heidelberg.

Peptide:
Met-Enkephalin (G), Leu-Enkephalin (G), Kyotorphin (G) von Prof. E. Wünsch und Prof. L. Moroder, MPI für Biochemie, Martinsried.

Dermorphin (G), Hyp^6-Dermorphin (G), $L\text{-}Ala^2$-Dermorphin (G) von Dr. R. de Castiglione, Farmitalia Carlo Erba, Mailand.

ß-Casomorphin-(1-5) und -(1-4) von Dr. A. Henschen, MPI für Biochemie, Martinsried

Dynorphin 1-13 (G) von Dr. A. Goldstein, Palo Alto, USA.

Somatostatin von UCB Bioproducts, Brüssel

D-Ala-Met-Enkephalin, α-Neo-Endorphin-(1-8), ß-Endorphin (Kamel), Leu-Enkephalin-Arg^6 von Peninsula, San Carlos, USA

Met-Enkephalin-Arg^6, Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 von Bachem, Bubendorf, Schweiz

Morphin-Hydrochlorid von Boehringer, Ingelheim

Levorphanol (Dromoran)-1-Tartrat-dihydrat (G), Etorphin (G) von Prof. A. Herz, MPI für Psychiatrie, München

Naloxon-Hydrochlorid von Endo Laboratories Inc., Garden City, N. Y., USA

Dibutyryl-cyclo AMP, Dithiothreitol von Boehringer, Mannheim

Diazepam, RO 20-1724 (G) von Hoffmann-La Roche, Grenzach

Mercaptoethanol, Reserpin, Carbachol·HCl, Rotiszint 11 und 22 , TCA von Roth, Karlsruhe

D-Tubocurarin·HCl von Calbiochem,Giessen

Phentolamin·HCl von Geigy, Basel, Schweiz

DL-Isopropylarterenol·HCl (Isoproterenol), Bacitracin, Aldosteron von Serva, Heidelberg

L-Arterenol·HCl, Dansylchlorid, Dansyl-aminosäuren, Jodessigsäure, Acetylcholin, Dexamethason, Testosteron, Progesteron, Corticosteron, Atropinsulfat, Rinderserumalbumin von Sigma, München

PGE_1 gekauft und (G) von Upjohn Diagnostics, Kalamazoo, USA

Adenosin, Bromcyan, Jodchlorid, Ninhydrin von Merck bzw. Merck-Schuchardt, Darmstadt

Puromycin·2HCl von Nutritional Biochemicals, Cleveland, USA

Ziegen-anti-Kaninchen-Antiserum-FITC von den Behring-Werken, Marburg

Peroxidase-anti-Peroxidase von Medac, Hamburg

Röntgen-Rapid-Entwickler und Fixierer, Adefo-Chemie, Nürnberg

Fluorescamin (Substanz und Fertigspray), Kristallviolett, Orange G, Xylencyanol FF von Fluka, Buchs, Schweiz

Radiochemikalien:

^{3}H-cyclo AMP (32-42 Ci/mmol), ^{3}H-Met-Enkephalin (20 Ci/mmol), ^{3}H-Dansylchlorid (36.7 Ci/mmol), ^{3}H-Naloxon (15-50 Ci/mmol), ^{3}H-Leucin (134 Ci/mmol), ^{35}S-Methionin (1032 Ci/mmol) von New England Nuclear, Dreieich

^{3}H-Leu-Enkephalin (39-64 Ci/mmol), ^{3}H-Leucin (53 Ci/mmol) ^{3}H-Met-Enkephalin (36 Ci/mmol) von Amersham-Buchler, Braunschweig

^{3}H-AcCh (G) von Dr. H. W. Chang und Prof. E. Neumann, MPI für Biochemie, Martinsried

II. Zellkultur

II. 1. Verwendete Zell-Linien

Glioma-Zell-Linie C6-BU-1

C6-BU-1 bezeichnet die bromdesoxyuridin-resistente Mutante (223) des Klons C6 einer Ratten-Gliomazell-Linie. Die C6-Zellen wurden aus dem Hirntumor einer

Ratte isoliert (224). Das Kulturmedium für C6-BU-1-Zellen besteht aus DMEM, 10 % FCS und 0.1 mM BUDR.

Polyploide Glioma-Zell-Linie C6-4-2

Durch Zellfusion von C6-BU-1- mit C6-TG-1-Zellen (Zellen, die gegen 6-Thioguanin resistent sind), wurde die Zell-Linie C6-2-3 erhalten (187, 188). Entsprechende Mutanten dieser Zellen miteinander fusioniert, ergaben die C6-3-Zellen und erneute Fusion von Mutanten dieser C6-3-Zellen ergaben die C6-4-2-Zellen (Klon 2) (187, 188). Als "Hybride" benötigen diese Zellen Kulturmedium aus DMEM, 10 % FCS und HAT (0.1 mM Hypoxanthin, 10 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin). Mit diesem Medium wird gegen die mutierten Elternzellen und für die Hybridzellen selektioniert (225).

Neuroblastoma-Zell-Linie N18TG2

N18TG2 bezeichnet eine 6-Thioguanin-resistente Mutante (226) des Klons N18 aus einem Neuroblastom einer Maus (227). Das Kulturmedium für N18TG2-Zellen besteht aus DMEM, 10 % FCS und 0.1 mM 6-Thioguanin.

Neuroblastoma-Zell-Linie NS20Y

NS20Y bezeichnet eine cholinerge Neuroblastoma-Linie, die aus dem spontanen Neuroblastom C1300 einer Maus isoliert wurde (227). Das Kulturmedium besteht aus DMEM, 10 % FCS.

Hybridzell-Linien 108CC5 und 108CC15

108CC5 und 108CC15 bezeichnet die "colony clones" Nr. 5 und Nr. 15, die nach Fusion von C6-BU-1-Gliomazellen mit N18TG2-Neuroblastoma-Zellen mittels Sendaivirus isoliert wurden (75, 76). Diese Zellen benötigen DMEM, 10 % FCS, HAT als Kulturmedium.

Hybrid-Hybrid-Zell-Linie NH15-CA2

NH15-CA2 bezeichnet einen Klon, der durch Fusion der adrenergen Neuroblastoma-Zellen N115-BU8 mit den cholinergen Hybridzellen 108CC15 entstanden ist (186, 187). Das Kulturmedium besteht aus DMEM, 10 % FCS, HAT.

Fibroblasten-Zell-Linie B82

B82 bezeichnet eine Mäuse-Fibroblasten-Linie, die nach Klonierung erhalten wurde und gegen BUDR resistent ist (228). Kulturmedium ist DMEM, 10% FCS, 0.1 mM BUDR.

Passagenummer P: Gibt an, wie oft die betreffenden Zellen subkultiviert wurden, d. h. mit Trypsin abgelöst und in ein anderes Kulturgefäß überführt wurden.

II. 2. Primärkulturen

Primärkulturen aus Gehirnen neugeborener NMRI-Mäuse (190, 229) wurden freundlicherweise von F. Löffler hergestellt.

II. 3. Methoden

Die hier für die Zellkultur verwendeten Materialien und fast alle Methoden sind von J. Traber (78) beschrieben worden. Deshalb wird nur die Zellzüchtung in 24-Behälter-Gewebekulturplatten und Petrischalen mit 145 mm Durchmesser ausführlich dargelegt.

10^4 Hybrid- oder Gliomazellen werden in 1 ml Wachstumsmedium in jede Vertiefung einer 24-Behälter-Gewebekulturplatte aus einer 5 ml-Pipette angesät und 4 Tage kultiviert. Es wird kein weiteres Medium zugesetzt.

7×10^5 bis 1×10^6 Hybridzellen bzw. 1×10^6 Glioma- oder Neuroblastomazellen werden in 1 ml Wachstumsmedium in Petrischalen mit 145 mm Durchmesser zu 60 ml Wachstumsmedium tropfenweise zugegeben. Die Zellen werden durch Schütteln der Platten in 5er-Stößen gut verteilt und 4 Tage kultiviert.

Konditioniertes Medium wurde in Anlehnung an (204) erzeugt; die Vorschrift wurde in einigen Punkten geändert. 4 - 5 Tage nach Ansäen (ca. $3\text{-}5 \times 10^6$ C6-4-2-Zellen) wurde das Wachstumsmedium durch 200 ml DMEM -HAT-Medium ersetzt (ohne DBCA). Nach 3 Tagen wurde das konditionierte Medium gesammelt und ohne weitere Behandlung auf Hybridzellen 108CC15 gegeben, die sich schon 3 Tage in Kultur befanden (7×10^5 Zellen waren angesät worden). 2 Tage später wurden die Zellen extrahiert. In einem Fall wurde das konditionierte Medium mit N2-Konzentrat (10-fach) (140) im Verhältnis 9 : 1 (v/v) gemischt.

III. Cyclo AMP-Bestimmung

III. 1. Isolierung von cyclo AMP-Bindungsprotein

Die Anreicherung wurde mit kleinen Änderungen nach der von J. Traber (78) beschriebenen modifizierten Methode nach Miyamoto et al. (230) durchgeführt. Statt 250 g wurden 1600 g Rinderschulter homogenisiert. Nach der Zentrifugation des Homogenats in einer Sorvall Kühlzentrifuge (GSA-Rotor, 13 000 UpM, 35 min) wurde der Überstand durch ein Nylonnetz passiert. Nach der Fällung mit 1 M AcOH und erneuter Zentrifugation betrug das Volumen 4640 ml. Dazu wurden 32.5g/100 ml $\triangleq$ 1506 g $(NH_4)_2SO_4$ langsam ($\sim$ 15 g/min) eingerührt. Nach 2-stündigem Rühren wurde im GSA-Rotor bei 16 000 g zentrifugiert, der Niederschlag in 350 ml 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 aufgenommen und jeweils 175 ml in einen Dialyseschlauch gegeben und gegen 65 l 5mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 über Nacht dialysiert. Die Lösung wurde anschließend 10 min. bei 10 000 UpM im SS34-Rotor in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert und nochmals durch ein Nylonnetz (NY 20) filtriert. Diese Lösung wurde auf eine Whatman DE-52-Säule (50 x 4 cm, Flußgeschwindigkeit 330 ml/h) aufgepumpt. Nach Waschen der Säule mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (3 h) und mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (5 h) wurde das Bindungsprotein mit 0.3 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 eluiert. Die Hauptfraktionen (30-44, je 10 ml) wurden vereinigt und gegen 65 l 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 dialysiert (24 h). Die dialysierte Lösung wurde in Portionen aufgeteilt und in flüssigem

Stickstoff eingefroren. Diese Lösung des Bindungsproteins konnte für die cyclo AMP-Bestimmung nach Traber (78) 1 : 12 verdünnt werden.

III. 2. Inkubation von Zellen mit Hormonen, Drogen und Extrakten

Die am Anfang der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche mit Zellen in Petrischalen (85 bzw. 60 mm Durchmesser) wurden analog der in (78, 86) beschriebenen Methode durchgeführt. Später wurde der Test miniaturisiert und die Extraktion und Reinigung des cyclo AMP modifiziert. Dies wird im Folgenden beschrieben.

Die Zellen werden in 24-Behälter-Gewebekulturplatten (16 mm Durchmesser) gezüchtet. Mit einer Sechsfachabsauganlage wird nacheinander in jeweils 6 Vertiefungen das Nährmedium abgesaugt. Der Zellrasen in jeder Vertiefung wird mit ca. 0.5 ml eiskaltem Inkubationsmedium gewaschen. Die Platte steht zum Pipettieren auf einem Gitterrost, der sich in einer mit Eis und Wasser gefüllten Plastikschale befindet. Das Inkubationsmedium besteht aus DMEM, das mit Hepes gepuffert ist (87). Sollen die Zellen mit einem den cyclo AMP-Spiegel erhöhenden Hormon inkubiert werden, wird dieses Hormon schon vorher zu der für den ganzen Versuch berechneten Menge eiskalten Inkubationsmediums zugemischt. Von dieser Mischung werden 270 µl in jede Vertiefung pipettiert. Nun werden 30 µl Zusätze zupipettiert, so daß in allen Vertiefungen das Endvolumen 300 µl beträgt. Nachdem die Platte zur Durch-

mischung der Inkubationslösungen einige Male geschwenkt wurde, wird sie 10 min im Wasserbad bei 37° C (oder 39°C) inkubiert. Inkubation bei 39° C führt zu einer Erwärmung des Inkubationsmediums auf 37°C (bei 37°C höchstens 35°C). Der Deckel der Kulturplatte liegt dabei umgedreht auf dem Unterteil des Inkubationsgefäßes. In den meisten Fällen wird jede Inkubation zweifach (2 Vertiefungen) ausgeführt. Da die Kontrollwerte (z. B. der durch PGE_1 maximal erhöhte cyclo AMP-Gehalt) gelegentlich von Platte zu Platte unterschiedlich ist, werden solche Inkubationen auf jeder Platte wiederholt.

Nach der Inkubation wird das Medium abgesaugt und die Platte in mit Trockeneis gekühltes Ethanol gestellt. In jede Vertiefung wird rasch 1 ml Ethanol (96 %; medizinisch; mit Trockeneis vorgekühlt) aus einer 25 ml Pipette gegeben. Da die cyclo AMP-Ausscheidung ins Medium vernachlässigbar ist, wird das Medium nach der Inkubation verworfen. Mittels einer Repetier-Hamiltonspritze werden in jede Vertiefung nun ca. 3000 cpm ^{3}H-cyclo AMP (10 µl) zur späteren Ausbeutebestimmung zupipettiert. Das intrazelluläre cyclo AMP ist in der alkoholischen Lösung enthalten. Diese wird direkt zur weiteren Reinigung des cyclo AMP verwendet.

III. 3. Reinigung und Bestimmung des intrazellulären cyclo AMP

Die Reinigung des cyclo AMP erfolgt mit zwei Änderungen wie in (78, 86) und (87, 91) beschrieben. Die ethanolische

Lösung wird direkt auf die Anionenaustauschersäulen gegeben, die 4 cm hoch mit AG 1-X 2-Harz,Cl^--Form, 200-400 mesh, gefüllt sind (unten sind sie mit Glaswolle verschlossen). Nach Waschen mit Wasser werden die Säulen mit 3 ml 0.1 M HCl eluiert. Das Eluat wird in Miniszintillationsfläschchen (5 ml) aufgefangen, für die Lyophilisation bei -80^{o} C eingefroren und nach der Lyophilisation in 400 µl H_2O wiederaufgenommen. 200 µl jeder Probe werden zur Ausbeutebestimmung (zwischen 60 und 80 %) auf ein Whatman GF/B-Filter (25 mm Durchmesser) aufgetragen und im Trockenschrank 1 h bei 100^{o} C getrocknet. Die Filter werden dann in Szintillationsgefäße aus Glas überführt, die zwischen 10 und 15 ml Szintillationsflüssigkeit ohne Detergens (z. B. Rotiszint 11) enthalten. Das auf dem Filter eingetrocknete ^3H-cyclo AMP löst sich unter diesen Bedingungen nicht in der Szintillationsflüssigkeit. Nach Entfernung des Filters kann der Szintillator wiederverwendet werden, sofern keine Filterrückstände in den Gläsern enthalten sind. Ist dies der Fall, wird der Szintillator aller Gläschen filtriert, auf den Radioaktivitätsgehalt hin kontrolliert und wiederverwendet. Diese Methode der Ausbeutebestimmung unterscheidet sich von der in (78) beschriebenen.

Der cyclo AMP-Gehalt eines Aliquots (meist 30 µl bei 108CC15-Zellen) der restlichen 200 µl jeder Probe wird nach dem Proteinbindungstest von Gilman (231), wie er in

(78) beschrieben ist, mit zwei Änderungen bestimmt. Erstens werden zur Sensitivitätserhöhung des Tests nur die Hälfte der von Traber (78) angegebenen Menge an ^{3}H-cyclo AMP und an Bindungsprotein eingesetzt. Die Eichkurve erstreckt sich unter diesen Bedingungen von 0.2 bis 20 pmol cyclo AMP. Diese Art der Eichkurve für die cyclo AMP-Bestimmung wurde von K. Hallermayer erarbeitet.

Das am Protein gebundene cyclo AMP wird durch Filtration über Cellulosenitrat-Membranfilter (0.45 µm Porenweite) von dem in der Lösung befindlichen radioaktiven cyclo AMP abgetrennt. Die Filter werden im Trockenschrank 30 - 60 min getrocknet (100° C) und wie die Ausbeutefilter in Glasszintillationsfläschchen in Rotiszint 11 gezählt. Die Trocknung der Filter (in gerolltem Zustand) ist die zweite Änderung gegenüber der Methode von Traber.

Mittels der ermittelten Eichgeraden wird - unter Einbeziehung der Ausbeuten, des Verdünnungsfaktors und der Proteinmenge pro Vertiefung - der intrazelluläre cyclo AMP-Gehalt $\pm$ Standardabweichung (SD) in pmol/mg Protein berechnet. Wird die Hemmung des hormonell bedingten cyclo AMP-Anstiegs untersucht, so werden die Ergebnisse zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Versuche normiert. Es wird die prozentuale Erniedrigung des maximal erhöhten cyclo AMP-Gehalts $\pm$ Standardabweichung berechnet. Sind in den Diagrammen bei einigen Punkten keine Standardabweichungen eingezeichnet, so sind diese kleiner als die Größe des Symbols.

Die Ergebnisse wurden mit dem programmierbaren Tischrechner HP-97 (Hewlett-Packard) ermittelt. Die Programme dazu schrieb freundlicherweise K. Wagner.

IV. Durchführung der Bindungsexperimente

IV. 1. Bindung von radioaktivem Naloxon an Hybridzellen in Suspension

IV. 1.1. Zellernte

Sie erfolgt 4 Tage nach Ansäen der Zellen (7×10^5-10^6 Zellen) in Petrischalen mit 145 mm Durchmesser. Die Arbeitsgänge sind:

1.) Platten 2 x mit je 7 ml eiskaltem Medium Puck's D 1, das mit Glucose und Saccharose isotonisch (320 - 340 mOsmol/1 eingestellt wird (= Puck'S D 1/Glu/Suc), waschen und nochmals mit 7 ml ca. 10 min bei 4° C inkubieren.

2.) Durch mechanische Erschütterung (Klopfen) Zellen ablösen, in 50 ml-Zentrifugenbechern sammeln, Platten mit ca. 2 ml Puck's D 1/Glu/Suc-Medium nachwaschen.

3.) Zellen bei 500 g zentrifugieren (Hettich Roto-Silenta).

4.) Pellet in einer solchen Menge kalten Puffers suspendieren, daß die Proteinkonzentration etwa 1 mg/ml beträgt. Als Puffer eignen sich z. B. 0.01 M Tris·HCl, 0.32 M Saccharose pH 7.4 (37° C) oder 0.05 M Natrium-

phosphatpuffer pH 7.4, der noch 0.05 M NaCl, 0.02 M Glucose, 0.1 M Saccharose und 0.8 mM $MgCl_2$ enthält. Suspendierte Zellen im Eis aufbewahren und möglichst rasch verwenden.

IV. 1.2. Inkubation der Zellen mit Zusätzen und radioaktivem Naloxon

Die Durchführung der Inkubationen und ihre Beendigung durch Filtration entspricht einer Kombination publizierter Methoden (83, 114). Die Inkubationen werden in Zentrifugengläsern (95 x 15 mm) durchgeführt. Das Endvolumen beträgt 1 ml. Es setzt sich wie folgt zusammen:

480 µl Puffer (derselbe, in dem die Zellen suspendiert sind)

500 µl Zellsuspension

10 µl ^{3}H-Naloxon in 0.32 M Saccharose

10 µl H_2O oder 10 µl 0.1 mM Naloxon

Der Arbeitsablauf:

1.) Die Inkubation (üblicherweise 10 min bei 37° C) wird durch Zugabe der Zellsuspension und Mischen am Vortex-Mixer gestartet.

2.) Die Inkubation wird durch rasche Vakuum-Filtration durch Whatman GF/B-Filter (25 mm Durchmesser) beendet. Die Zellen werden dazu mittels einer Pasteurpipette auf das vorher angefeuchtete Filterplättchen überführt und dieses mit 10 ml eiskaltem Puffer nachgewaschen. Das Vakuum wird durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt. Der ganze Vorgang sollte nach 10 sec beendet sein.

3.) Die Filter werden in Plastikszintillationsfläschchen mit 10 ml Rotiszint 22 (mit Triton X-100) über Nacht inkubiert und nach kräftigem Schütteln im Szintillationszähler bei 35 - 45 % Zählausbeute je nach Gerät gezählt. Die Werte werden in Duplikaten oder Triplikaten bestimmt. Die Einzelwerte schwanken ca. $\pm$ 10 % um die Mittelwerte.

IV. 2. Bindung von Opioiden an Hybridzellmembranen

IV. 2.1. Herstellung von Membranen

Die Zellen werden gezüchtet und geerntet wie unter IV. 1.1., Punkt 1 - 3 beschrieben. Nach der Zentrifugation schließen sich folgende Arbeitsgänge an:

1.) Zellniederschlag in 10 ml 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25°C) suspendieren und in einen motorgetriebenen Potter-Elvehjem-Glas-Homogenisator überführen.

2.) Im Kühlraum unter Eiskühlung bei maximaler Umdrehungszahl des Motors die Zellen durch 50 - 70 schnelle Auf- und Abbewegungen homogenisieren (Zahl der Auf- und Abbewegungen ist für den jeweils verwendeten Homogenisator spezifisch!).

3.) Güte des Aufschlusses unter dem Mikroskop überprüfen (1 Tropfen Homogenat + 1 Tropfen Nigrosin vermischen und auf einem Objektträger anschauen). Nigrosin wird zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Zellen verwendet (siehe Traber (78)). Gegebenenfalls durch weitere Auf- und Abbewegungen Aufschluß vervollständigen.

4.) Homogenat in 50 ml-Zentrifugenbecher 10 min bei 900 g zentrifugieren. Überstand in einen für den Rotor SS34 geeigneten Zentrifugenbecher überführen. Niederschlag in 30 ml Tris·HCl-Puffer resuspendieren, zentrifugieren und die Überstände vereinigen.

5.) Überstände in einer Sorvall-Kühlzentrifuge 10 min bei 15 000 g zentrifugieren (10 000 UpM im SS34-Rotor).

6.) Die sedimentierten Membranen durch Resuspension in 30 ml Tris·HCl-Puffer und Zentrifugation waschen.

7.) Den letzten Niederschlag in einem solchen Volumen 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25^{o}C) suspendieren, daß etwa eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml erhalten wird, d. h. bei Aufarbeitung von Zellen aus 30 nahezu konfluenten Petrischalen (145 mm Durchmesser) etwa 10 - 13 ml.

8.) Einige Kristalle Desoxyribonuclease I hinzufügen, gut triturieren und die Membranen etwa 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.

9.) Membranen - eventuell nach Überprüfung der Homogenität unter dem Mikroskop - in Portionen (5 ml, Polypropylenröhrchen) aufteilen und in flüssigem Stickstoff einfrieren und lagern.

IV. 2.2. Inkubation der Membranen mit radioaktiven Opioiden und Zusätzen

Der Bindungstest wird mit einigen Modifikationen nach Pert und Snyder (114) durchgeführt. Das Gesamtvolumen beträgt 0.5 ml und setzt sich wie folgt zusammen:

320 µl 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C)

30 µl ^{3}H-Leu-Enkephalin oder ^{3}H-Naloxon in 0.05 M Tris-HCl

50 µl 0.05 M Tris·HCl oder 10 µM Leu-Enkephalin bzw. 0.1 mM Naloxon in 0.05 M Tris·HCl bzw. sonstige Zusätze

100 µl Membranen (300 - 500 µg Protein)

Da alle Zusätze in Tris·HCL-Puffer gelöst sind, können die Mengen auch variiert werden. Die Konzentration an ^{3}H-Leu-Enkephalin beträgt 7nM (ca. 250 000 cpm bei 64 Ci/mmol spezifischer Radioaktivität) bzw. 16 nM ^{3}H-Naloxon. Die Inkubationen werden in Zentrifugengläsern (95 x 15 mm) bei 25°C durchgeführt. Die Membranen werden im Eis aufbewahrt. Der Versuch wird wie folgt ausgeführt.

1.) Bis auf die Membranen alle Komponenten in jedes Glas einpipettieren.

2.) Durch Zugabe von Membranen und Mischen am Vortex-Mixer nach Stoppuhr jede volle Minute eine Inkubation starten.

3.) Nach 10 min und Starten der 11. Inkubation Glas 1 herausnehmen, 4 ml eiskalten Puffer (0.05 M Tris·HCl,pH 7.4 (25° C)) hinzufügen und den Inhalt auf ein vorher befeuchtetes Whatman GF/B-Filter (25 mm Durchmesser) kippen. Das Filterplättchen ist in einem Filtrationsgerät eingespannt. Filter mit 10 ml eiskalten Puffer nachwaschen. Der gesamte Vorgang soll in 10 sec beendet sein. Filter in Plastikszintillationsfläschchen überführen und damit am Ende so weiterverfahren wie in IV. 1.2, Punkt 3, beschrieben. Nun jede Minute eine Inkubation starten und eine beenden. Ein gleichmäßiger

Rhythmus ist wichtig. Das Vakuum soll von einer Wasserstrahlpumpe erzeugt werden (schnellerer Durchfluß als bei Verwendung einer Dürr-Dental-Ölpumpe). Das Filterplättchen wird am besten durch Eintauchen in Puffer vor dem Auflegen befeuchtet. Die Inkubationen werden in Duplikaten oder Triplikaten ausgeführt.

Die Differenz zwischen Meßwerten, die in Ab- und Anwesenheit von 1 /uM nichtmarkiertem Leu-Enkephalin bzw. 10 /uM Naloxon erhalten werden, wird gemäß (110) als spezifische Bindung definiert. Bei Kompetitionsversuchen mit Opioiden wird die so erhaltene spezifische Bindung in Abwesenheit von Zusätzen als 100 %-Wert gesetzt. Die prozentuale Hemmung ± SD der spezifischen Bindung durch Zusätze wie Opioide wird mit Hilfe eines von K. Wagner erstellten Programmes mit dem HP-97-Tischrechner ermittelt.

Bei anderen Experimenten wie Zeit- oder Konzentrationsabhängigkeiten der Bindung von radioaktiven Liganden müssen jeweils 2 Testreihen durchgeführt werden. Eine mit radioaktivem Liganden zur Bestimmung der Gesamtbindung, eine weitere in Gegenwart des kalten Liganden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung. Die Differenz ergibt die spezifische Bindung. Diese kann in solchen Experimenten unter Einberechnung der Zählausbeute, des Umrechnungsfaktors dpm→ nCi (= 2220), der spezifischen Radioaktivität und der eingesetzten Proteinmenge als pmol ± SD gebunden pro mg Protein ausgedrückt werden.Die in Abwesenheit von Zellmaterial an die Filter gebundene Radioaktivität ist von den gemessenen Werten abzuziehen.

Bestimmung von Opioidaktivität mittels eines radioimmunologischen Tests

Der RIA wird mit kleinen Änderungen nach der Vorschrift durchgeführt, die von D. van Calker (85) in unserem Labor erarbeitet wurde. Wegen dieser Abänderungen und der zentralen Bedeutung des RIA in dieser Arbeit wird der Arbeitsgang nochmals beschrieben.

Benötigte Lösungen:

1.) ^{3}H-Leu-Enkephalin, ca. 11 000 cpm/10 µl bei 40 Ci/mmol spezifischer Radioaktivität, gelöst in RIA-Puffer.
2.) 0.1 µM Leu-Enkephalin in RIA-Puffer
3.) 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C)
4.) 0.05 M Tris·HCl, 4 mM Na_2EDTA, 0.1 % Rinderserumalbumin (W/v) pH 7.4 (4° C) ≙ RIA-Puffer
5.) 0.05 M Tris·HCl, 4 mM Na_2EDTA, pH 7.4 (4° C), zum Nachwaschen
6.) Antiserum, mit RIA-Puffer 1:200 verdünnt.
Bei einer Verdünnung von 1:200 werden bei der Inkubation ohne Zusatz "kalten" Leu-Enkephalins 30 - 40 % des radioaktiven Leu-Enkephalins gebunden.

Tab. 27 zeigt das verwendete Pipettierschema. Sofern genügend Extraktmaterial vorhanden ist, wird routinemäßig der Opioidgehalt darin bei 3 Konzentrationen (5, 10, 20 µl eingesetzt, Duplikate) bestimmt.

Tab. 27. Pipettierschema zur radioimmunologischen Bestimmung von Leu- und Met-Enkephalin

Inkubation Nr.	^{3}H-Leu-Enkephalin 11 000 cpm (/ul)	RIA-Puffer (/ul)	Leu-Enkephalin (0.1/uM) (/ul)	Leu-Enkephalin (pmol)	Tris·HCl 0.05 M pH 7.4 (25°C) (/ul)	Proben (/ul)	Antiserum 1:200 (/ul)
1	10	170	-	-	20	-	50
2-4	↓	120	-	-	↓	-	↓
5-7	↓	118	2	0.2	↓	-	↓
8-10	↓	115	5	0.5	↓	-	↓
11-13	↓	110	10	1	↓	-	↓
14-16	↓	100	20	2	↓	-	↓
17-19	↓	70	50	5	↓	-	↓
20-22	↓	20	100	10	↓	-	↓
23 ff.	↓	120	-	-	-	20	↓

Die Durchführung des RIA umfaßt folgende Arbeitsvorgänge:

1.) Eppendorf-Reaktionsgefäße in Eis stellen und alles nacheinander entsprechend dem Pipettierschema einpipettieren. ^{3}H-Leu-Enkephalin mit Hamilton-Repetierspritze, Leu-Enkephalin mit 50/ul-Hamiltonspritze, Puffer mit Pipetman und Extraktlösungen mit Transferpettor (5 - 25/ul) pipettieren. Das Antiserum zum Schluß mit Hamilton-Repetierspritze dazugeben und Inhalt der Reaktionsgefäße am Vortex-Mixer sofort mischen.

2.) Proben mindestens 2 h bei 4° C inkubieren.

3.) Nach beendeter Inkubation 800 µl eiskalten Nachwaschpuffer (0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (4°C), 4 mM Na_2EDTA) zu jeweils sechs Proben geben. Diese stehen dabei in Eis.

4.) Jeweils eine Probe mittels Pasteurpipette auf ein Cellulosenitratfilter geben (die gleichen wie für den cyclo AMP-Test verwendeten, 25 mm Durchmesser) und mit 10 ml eiskaltem Puffer nachwaschen.

5.) Filter wie beim cyclo AMP-Test 30 - 60 min bei 100° C trocknen und in Glasszintillationsfläschchen in Polizint 11 zählen. Es können dieselben Gläschen wie für die cyclo AMP-Bestimmung verwendet werden. Die Eichkurve wird durch eine logit-log-Auftragung linearisiert (d. h. $\log \frac{Ix}{Io-Ix}$ gegen log pmol). Mit Hilfe eines von K. Wagner erstellten Programms wird daraus der Gehalt an immunreaktiven Leu-Enkephalin-Äquivalenten in pmol berechnet. Aus der Ausgleichsgeraden (bei Bestimmung von drei Duplikaten je Extrakt) wird der Gehalt an Enkephalin-Äquivalenten bestimmt. Daraus errechnet sich unter Einbeziehung der Ausbeute und der extrahierten Proteinmenge die spezifische Aktivität.

Herstellung und Reinigung von Zellextrakten

1. Partiell gereinigte Extrakte

Partiell gereinigte Zellextrakte werden auf folgende Weise erhalten:

1.) Zellen in Petrischalen (145 mm Durchmesser) 2 x gut mit je 7 ml Medium Puck's D1/Glu/Suc (37° C) waschen.

2.) 8 ml eiskalte 1 M AcOH oder 8 % TCA hinzufügen. Platten für ca. 1 h bei 4^{o} C stehenlassen.

3.) Die Extrakte von der gewünschten Anzahl an Platten vereinigen (Erlenmeyer- oder Rundkolben), ca. 6.5×10^4 dpm ^{3}H-Leu-Enkephalin (im Bedarfsfall zusätzlich ca. 6.5×10^4 dpm ^{3}H-Met-Enkephalin) zur späteren Ausbeutebestimmung hinzugeben und bei -20^{o}C oder kälter einfrieren und lyophilisieren. TCA-Extrakte mit Ether ausschütteln (s. X. 1., S.252).

4.) Lyophilisat in ca. 10 ml H_2O aufnehmen, in 12 ml Polypropylenröhrchen überführen und 10 min bei 1700 g zentrifugieren.

5.) Überstand auf Bio-beads geben und aufrühren (mit zugeschmolzener, langer Pasteurpipette).

6.) Herstellung der Bio-beads-Säulen:

a.) Bio-beads SM-2 in absolutem Ethanol für mindestens 1 h waschen

b.) Gewaschene Bio-beads in eine mit Glaswolle verschlossene, abgeschnittene 10 ml-Glaspipette etwa 12 cm (8 ml) hoch einfüllen (für die Aufarbeitung von Medien werden abgeschnittene, 17 cm ($\triangleq$ 17 ml) hoch gefüllte 25 ml-Pipetten verwendet). Die Säule hat einen Schlauch mit Schlauchklemme als Ausfluß und ist oben mit einem Plastiktrichter versehen (wie die Ionenaustauschersäulen bei der cyclo AMP-Bestimmung). Wegen der in der Kälte verringerten Blasenbildung bei Ethanol-Zugabe befinden sich die Bio-beads-Säulen im Kühlraum.

c.) Säulen mit 10 ml 50 % Ethanol waschen, anschließend mit mindestens 30 ml 0.01 M Tris·HCl, pH 7.4 (25°C), unter gelegentlichem Aufrühren der Kügelchen, um Luftblasen zu entfernen.

7.) Bei geschlossener Schlauchklemme wird der Extrakt ca. 30 min auf der Säule belassen, damit die Enkephaline adsorbiert werden können.

8.) Anschließend die Flüssigkeit langsam (ca. 6 Tropfen/min) aus der Säule in einen Erlenmeyer-Kolben tropfen lassen.

9.) Wenn der Extrakt vollständig eingesickert ist, mit 10 ml 0.01 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C), nachwaschen.

10.) Adsorbierte Enkephaline durch 20 ml 50 % Ethanol in einen 25 ml Rundkolben eluieren.

11.) Eluat am Rotationsverdampfer eindampfen.

12.) Bio-beads unter 96 % Ethanol aufbewahren. Vor der nächsten Benutzung durch 10 ml 96 % Ethanol, 10 ml Methanol und 10 ml 96 % Ethanol regenerieren und entsprechend 6 c) waschen. Die Säulen können solange wiederverwendet werden bis die Endausbeuten an ^{3}H-Enkephalin schlechter werden ($<$ 35 - 40 %).

13.) Am Rotationsverdampfer eingedampftes Eluat in 700 µl H_2O aufnehmen, einfrieren oder, falls unlösliche Bestandteile enthalten sind, nach Zentrifugation in der Mikroliter-Tischzentrifuge (in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß) auf eine Sephadex LH-20-Säule (100 x 1 cm) auftragen und im Kühlraum mit 0.1 M AcOH bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 3.8 ml/h eluieren. Fraktionen von 20 - 25 Tropfen ($\triangleq$ 0.8 - 1.0 ml) auffangen.

14.) Radioaktives Leu-Enkephalin enthaltende Fraktionen in einem silanierten (s. unten) 10 ml-Rundkolben vereinigen und lyophilisieren. Restliche Fraktionen ebenfalls vereinigen, lyophilisieren, aufnehmen und eingefroren aufbewahren.

15.) Lyophilisat in 200 µl 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C) aufnehmen, 10 µl zur Radioaktivitätsmessung entnehmen und in Eppendorf-Reaktionsgefäß einfrieren oder testen oder weiterverarbeiten. Extrakte aus Medien müssen mit NaOH (1 M bzw. 5 M) neutralisiert werden. Für die weitere Reinigung werden solche Extrakte in H_2O aufgenommen. Auf diese Weise gereinigte Extrakte werden als partiell gereinigt bezeichnet. Die Ausbeuten an ^3H-Leu-Enkephalin liegen bei solchen Extrakten im Durchschnitt bei 40 - 50 %.

VI. 2. Weitere chromatographische und analytische Verfahren

VI. 2.1. Gelchromatographie

Die Vorbereitung der verwendeten Sephadextypen (G-75, LH-20) und von Biogel P-4 erfolgt nach (232). Das Material wird bei Raumtemperatur gequollen (im Elutionspuffer). Die Säule wird im Kühlraum unter Verwendung eines Einfüllstutzens mit der entgasten, dicken Suspension des Gels in einem Guß gefüllt. Nach etwa 30 min Absitzenlassen wird die Säule mit dem gewünschten Fluß gleichmäßig gepackt. Die Säulen werden vor dem ersten Lauf und nach den einzelnen Läufen bei konstantem Fluß gut eluiert, um die Packung zu optimieren und

Verunreinigungen zu entfernen. Die LH-20-Säulen laufen über Monate ununterbrochen. Zwischen zwei Läufen wird mindestens 24 h gespült. Biogel P 4- und Sephadex LH-20-Säulen werden mit 0.1 M AcOH eluiert. Die Sephadex G-75-Säule wird mit 0.05 M NH_4AcO, pH 6.5 , eluiert. Die Probenvolumina sind 1 - 2 % des Gelbettvolumens. Weitere Angaben sind in den Legenden zu den Abbildungen enthalten. Das Ausschlußvolumen wird bei G-75 mit Dextranblau, bei Biogel P-4 mit Trypsin (Messung von Δ E 280 nm) bestimmt.

VI. 2.2. Ionenaustauschchromatographie

VI. 2.2.1. mit Whatman DE-52

Die Vorbereitung des Anionenaustauschers erfolgt nach Angaben des Herstellers (233). Die Äquilibrierung wird zu Beginn durch Waschen im "batch"-Verfahren mit 10-fach konzentriertem Startpuffer beschleunigt. Nach Packen der Säule wird mit Startpuffer solange eluiert, bis der pH-Wert und die Leitfähigkeit von Startpuffer und Eluat gleich sind.

Die Proben werden mittels Pipette oder, bei größeren Volumina, mittels Schlauchpumpe aufgegeben. Eluiert wird erst mit Startpuffer, dann mit einem linearen Ionenstärke-Gradienten oder einem Ionenstärke-Stufengradienten (beim cyclo AMP-Bindungsprotein). Der lineare Gradient wird entweder mit einem elektronischen Gradientenmischer oder durch die Verwendung zweier gleichgroßer, verbundener Mischgefäße erzeugt, die mit gleichen Volumina Start- und Endpuffer gefüllt werden. Weitere Angaben siehe Legende zu den Abbildungen.

VI. 2.2.2. an AG 1-X 8 - Harz

Zur Reinigung von Enkephalinen wird die Methode nach (145) verwendet. Eine 20 x 1 cm-Säule wird mit Harz gefüllt (100 - 200 mesh, Cl^--Form), mit 1 M AcOH in die Ac^--Form gebracht (bis im Eluat kein Cl^- mehr nachweisbar ist) und mit 0.1 M NH_4AcO, pH 8.0, äquilibriert. Nach Probenauftrag wird mit 50 ml desselben Puffers gewaschen, anschließend mit 60 ml 0.1 M AcOH eluiert.

Alternativ wird das Harz mit 2 M NaOH in die OH^--Form gebracht und mit H_2O chloridfrei gewaschen. Anschließend wird durch 2 M Ameisensäure die Formiat-Form erhalten und mit H_2O bis zur Neutralität gewaschen. Nach Probenauftrag wird zuerst mit H_2O, dann mit unterschiedlich konzentrierten Ameisensäurelösungen (Stufengradient) eluiert.

VI. 2.2.3. an Sephadex CM-50

Die berechnete Menge an Sephadex CM-50-Kationenaustauschergel wird in 1 M NH_4AcO gequollen, im "batch"-Verfahren einige Male (ca. 5 mal) mit 5 mM NH_4AcO, pH 6.0, gewaschen und in eine dünne Säule (ev. lange Pasteurpipette) eingefüllt und mit 5 mM NH_4AcO, pH 6.0, äquilibriert (Vergleich des pH-Werts von Eluat und Startpuffer). Nach Probenauftrag wird durch Stufengradienten mit unterschiedlich konzentrierten NH_4AcO-Puffern, pH 6.0, eluiert (5 mM bis 2 M).

VI. 2.3. Dünnschichtchromatographie

Für die Chromatographie werden Dünnschichtfertigplatten (0.25 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator von Merck) verwendet. Die Proben werden punkt- oder strichförmig mittels 5 µl-Kapillaren 2 cm vom Rand entfernt aufgetragen und in früherer Zeit mit einem Fön, in neuerer Zeit im N_2-Strom getrocknet. Enkephaline und partiell gereinigte Extrakte werden in einem Laufmittel nach (234) aufgetrennt. Das Laufmittel besteht aus Butanol-1: AcOH: H_2O = 60:15:25 (^{v}/v). Die Tanks werden ca. 1 h äquilibriert, die Laufzeiten betragen 4 - 6 h.

Radioaktive Enkephaline werden mit Hilfe eines Dünnschichtscanners lokalisiert, mitchromatographierte Standard-Enkephaline durch Besprühen mit Fluramreagenz (s. unten). Die Spuren der Extrakte werden entsprechend dem Radiochromatogramm fraktioniert (mit einem Spatel ausgekratzt). Eluiert wird entsprechend Ref.235. Das Kieselgel wird durch einen kleinen Trichter in eine lange Pasteurpipette (150 mm) gefüllt, die mit 1/3 eines Whatman GF/C-Filters (25 mm Durchmesser) verschlossen und mehrmals (ca. 4 x) mit je 2 ml 50 % EtOH gewaschen ist. Adsorbiertes Material wird 4 x 10 min mit je 1 ml 50 % Ethanol unter Aufwirbeln des Materials extrahiert und die Lösung jedesmal mit N_2 in vorher silanierte Gläser (95 x 12 mm) gepreßt. Das Lösungsmittel wird am Speed vac Concentrator abgezogen. Nach Aufnehmen der Proben in 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25°C), (100 - 200 µl) werden die Proben in Eppendorfgefäße überführt und enthaltene

Kieselgelpartikel in der Mikroliter-Tischzentrifuge abgetrennt.

Fluramreagenz wird entweder als fertiges Sprühreagenz gekauft oder selbst hergestellt (236): 1 mg Fluram + 1 ml Pyridin + 90 ml Aceton.

VI. 2.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Es werden analytische (250 x 4.6 mm) C 18-"Reversed-phase"-Fertigsäulen verwendet, die mit 5 µm- bzw. 10 µm-Material gefüllt sind. Für die Reinigung partiell vorgereinigter Extrakte wird die 10 µm-Säule mit einer fertigen Vorsäule (40 x 4.6 mm) gekoppelt, die mit dem gleichen Material gefüllt ist. Die Lebensdauer der Hauptsäule wird dadurch verlängert. Die Puffer werden durch Membranfilter (0.45 µm Porenweite, 47 mm Durchmesser) filtriert und wäßrige Lösungen im Vakuum entgast. Organische Elutionsmittel (z. B. Propanol-1, Acetonitril etc.) werden weder filtriert noch entgast. Für den Routinebetrieb wird H_2O aus der Nanopure-Anlage und sonstige Lösungsmittel des Reinheitsgrades p. A. verwendet. Für hochreines Arbeiten werden Spezial-Lösungsmittel für die HPLC bzw., falls nicht existent, für die Spektroskopie oder Chromatographie verwendet.

Zwei Elutionssysteme werden hauptsächlich benutzt:

a.) 0.01 M NH_4AcO, pH 4.5, 41 % Methanol. Eine 0.01 M entgaste AcOH-Lösung wird mit 25 % Ammoniak auf pH 4.5 eingestellt, mit 41 % Methanol versetzt und filtriert.

Die 10/um -Säule wird mit einem Fluß von 1.5 ml/min, äquilibriert (bis die Basislinie des Spectromonitors bei 210 nm und der zweithöchsten Empfindlichkeitsstufe stabil ist) und eluiert (1 ml/min bei der 5/um-Säule).

b.) 5 % AcOH und Propanol-1 nach (170). Der Durchfluß beträgt 1.0 ml/min (10/um-Säule). Startbedingungen sind 10 % ($^{v}/v$) Propanol -1 und 90 % ($^{v}/v$) 5 % ige AcOH. Nach Injektion der Probe wird ein linearer Gradient von 10 % auf 40 % Propanol innerhalb von 20 min angelegt (Exponent am "Gradientmaster" m = 1). Zur Trennung von Met(o)-, Met- und Leu-Enkephalin wird ein konkaver Gradient (Exponent m = 3) für 30 min benutzt. Die UV-Extinktion wird hier bei 280 nm gemessen.

Das injizierte Volumen beträgt maximal 100/ul. Die Extrakte werden vor der Injektion in der Mikroliter-Tischzentrifuge mehrmals zentrifugiert. Fraktionen werden entweder jeweils nach 2 min oder entsprechend der Eichung mit synthetischen Enkephalinen in silanierten Gläsern oder Rundkolben aufgefangen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer oder im Speed vac Concentrator abgezogen.

Die Säule wird zum Schluß umgedreht eingebaut und gut mit Methanol gespült. Gelegentlich folgt eine gründliche Spülung mit Dichlormethan und n-Hexan.

VI. 2.5. Hochspannungspapierelektrophorese

Die HVPE wird nach (236) durchgeführt. Folgendes Puffersystem für pH = 3.5 wird verwendet (für einen Tank): Pyridin (dest.) + AcOH (dest.) + H_2O = 40.6 + 406 + 18000 ml. Als Kühlmittel wird durch Faltenfilter filtriertes Varsol (= Testbenzin 145/200) benutzt. Dieses wird durch einen auf 5° C eingestellten Kryostaten gekühlt. Als sichtbare Farbmarker werden je 10 µl Kristallviolett (0.25 % (W/v)), Xylencyanol FF (0.5 % (W/v)) und Orange G (0.5 % (W/v)) verwendet.

Die Proben werden punkt- oder strichförmig in der Mitte des Bogens, (110 x 28.5 cm, Whatman 3 MM) oder auf der anodischen Seite 30 cm vom Rand entfernt mittels 5 µl-Kapillaren aufgetragen und mit einem Fön oder besser im N_2-Strom getrocknet. Das Papier wird in den Kunststoffrahmen eingespannt und mit Elektrodenpuffer besprüht. Um die Probenauftragsstelle wird eine schmale Zone nicht besprüht. Durch Diffusion des Puffers in diesem Bereich werden die aufgetragenen Proben konzentriert.

Die Elektrophorese wird 3 - 4 h bei 5000 V und ca. 50 mA durchgeführt. Die Temperatur steigt in dieser Zeit auf ca. 20° C. Der Bogen wird daran anschließend über Nacht im Abzug bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lokalisation von Substanzen erfolgt wie bei der DC durch "Scanning" der radioaktiven Enkephaline und durch Besprühen mit Fluramreagenz.

Nach Lokalisation werden die interessierenden Streifen ausgeschnitten. An beide Enden des Streifens werden gründlich voreluierte Papierstreifen (Whatman 1) angenäht. Einer davon ist spitzauslaufend und endet in einem Becherglas. Der andere taucht in ein Vorratsgefäß mit 0.1 M Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6.4, (0.1 M an Pyridin) ein. Die Proben werden auf diese Weise absteigend in einem äquilibrierten DC-Tank eluiert (ca. 20 - 30 ml). Die Wiederfindung an ^{3}H-Leu-Enkephalin beträgt 90 %. Pyridin (2 l) wird nach (236) über Ninhydrin (5 g) am Rückfluß gekocht (1 h) und über eine Kolonne destilliert. Wiederholung erfolgt nach 3 - 4 Monaten. Eisessig wird ebenfalls destilliert.

Wenn der Extrakt nach der HVPE weiter gereinigt werden soll, so werden das Papier und die damit in Berührung kommenden Gegenstände nur mit Plastik-Handschuhen angefaßt.

. 3. Reinigung und Silanierung von Glasgefäßen

Standard-Enkephalinlösungen und Extrakte, aus denen Opioide vollständig gereinigt werden sollen, werden ausschließlich in mit Chromschwefelsäure gereinigten Glasgefäßen aufbewahrt. Alle für die weitere Aufarbeitung benötigten Lösungsmittel befinden sich ebenfalls in derart gereinigten Gefäßen. Die Chromschwefelsäure wird gelegentlich erneuert. Sie wird so hergestellt: 250 g pulverisiertes $K_2Cr_2O_7$ in H_2O anteigen und unter Rühren in 5 l konzentrierter Schwefelsäure lösen.

Die Glasgefäße werden mindestens 1 h darin inkubiert, gut gespült und im Trockenschrank bei 100°C getrocknet. Rundkolben und Fraktionsgläser werden anschließend wie folgt silaniert:

a.) 1 %ige (v/v) Lösung von Dichlordimethylsilan in Benzol herstellen und im Heizpilz auf ca. 60° C erwärmen.

b.) Gläser (evtl. vorgewärmt) mit dieser Lösung gut ausspülen und danach im Trockenschrank (100° C) trocknen.

c.) Vorgang wiederholen.

Zur Aufbewahrung werden hochgereinigte Gefäße mit Aluminiumfolie vor Verstaubung geschützt. Mit Lösungsmitteln in Berührung kommende hochreine Gegenstände werden nur mit Plastik-Handschuhen angefaßt.

II. Behandlung von Extrakten mit verschiedenen Reagentien

II. 1. Behandlung mit Proteasen

II. 1.1. Allgemeine Vorschrift

Hyaluronidase, Papain, Trypsin, Pronase, Chymotrypsin, Proteinase K werden in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C), gelöst. 10 - 20 µl davon werden eingesetzt. Endvolumen: 100 µl. Die Inkubationen (meist 30 min bei 37° C) werden durch Hitze (4 - 5 Min im kochenden H_2O-Bad) gestoppt. Die Endkonzentration an Enzym beträgt 0.01 - 0.02 %.

Von der Leucinaminopeptidase-Suspension (5 mg/ml, 100 U/mg) werden 7 µl in 87.5 µl 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C) gelöst und 20 µl davon eingesetzt (100 µl Endvolumen). Acetylcholinesterase ist in einer Konzentration von 1 mg/ml in 5 mM Tris·HCl, pH 7.4 (25° C) gelöst. 1 mg Dispase wird in 3 ml PBS gelöst und 10 µl auf 100 µl eingesetzt.

4 µl Carboxypeptidase A werden nach (237) in 100 µl 5mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5, 1 M NaCl enthaltend, durch 1 - 2 stündiges Stehenlassen im Eis gelöst. 10 - 20 µl der Lösung werden auf 100 µl eingesetzt.

Alle Inkubationen werden durch Hitze (s. o.) gestoppt. Die Proben sind alle in 0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C), gelöst.

VII. 1.2. Behandlung mit Pepsin

Pepsin wird in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0.1 mM HCl gelöst. Die Inkubationslösung (Endvolumen 100 /ul) setzt sich wie folgt zusammen:

80 /ul 0.05 M Tris•HCl, pH 7.4 (25° C), oder Probe in diesem Puffer

20 /ul Pepsin in 0.1 mM HCl

5 /ul 1 M HCl.

Der pH-Wert dieser Lösung liegt zwischen 1.5 und 2.0.

Nach Inkubation (meist 30 min bei 37° C) werden alle Proben mit 5 /ul 1 M NaOH neutralisiert.

VII. 1.3. Behandlung mit einer Enzymmischung

Die den cyclo AMP-Spiegel erhöhende Fraktion (s. Kap. II. 1.3., S.83) wird mit einer Mischung aus verschiedenen Enzymen behandelt:

4 /ul Hexokinase (1 U) + 2 /ul Myokinase (1.4 U) + 100 /ul 5'-Nucleotidase (1 U) $\pm$ 2 /ul Adenosindesaminase (1 U) + 42 /ul H_2O. 20 /ul dieser Mischung werden auf 120 /ul Endvolumen eingesetzt, zusammengesetzt aus:

50 /ul H_2O bzw. Probe

50 /ul Puffer

20 /ul Enzymlösung

Puffer: 0.05 M Tris•HCl, pH 7.4 (25° C), 5 mM $MgCl_2$, 0.1 M Glucose.

90 min bei 37° C inkubieren, anschließend 4 min in kochendem Wasser stoppen.

Mit Hilfe dieser Enzymmischung sollen die Adeninnucleotide in Inosin überführt werden.

VII. 2. Behandlung mit Bromcyan

Pro Ansatz werden 0.5 mmol BrCN (≙ 52.9 mg) in 1 ml 70 % HCOOH eingesetzt. Die berechnete Menge wird im entsprechenden Volumen gelöst. 1 ml der BrCN-Lösung bzw. 1 ml 70 % HCOOH (für die Kontrollen) werden in 20 ml-Plastikszintillationsfläschchen mit 100 µl Probe gemischt. Die Proben werden gut verschlossen und mit Aluminiumfolie umhüllt 24 - 48 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird mit je 10 ml H_2O verdünnt und lyophilisiert. Die Proben werden in 1 - 2 ml H_2O aufgenommen, in kleinere Gefäße (Miniszintillationsfläschchen) überführt, eingefroren und erneut lyophilisiert. Anschließend wird in 200 µl 0.05 Tris·HCl, pH 7.4 (25° C), aufgenommen. Alle Arbeiten und Inkubationen bis zur 1. Lyophilisation müssen im Abzug durchgeführt werden. Die Abluft des Gefriertrockners wird ebenfalls in den Abzug geleitet.

VII. 3. Behandlung mit Perameisensäure

Die Reaktion wird entsprechend (238) durchgeführt. 5 ml 30 % H_2O_2 und 95 ml HCOOH werden in einem verschlossenen Gefäß 2 h bei 25° C (Wasserbad) unter leichtem Rühren (Magnetrührer) inkubiert. Danach werden 15 ml davon mit der Probe (0.5 ml in H_2O) in einem 1 l-Rundkolben (silaniert) vermischt und 2.5 h im Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 ml vorgekühlten Wassers wird die Lösung in flüssigem

N_2 eingefroren und lyophilisiert. Wasserzugabe und Lyophilisation werden wiederholt. Anschließend wird in kleinem Volumen Puffer bzw. H_2O (200 - 500 µl) aufgenommen.

VII. 4. Behandlung mit Wasserstoffperoxid

Die Reaktion wird gemäß Ref. (64) durchgeführt. 0.5 µmol Met-Enkephalin (0.5 ml) werden mit 50 µmol H_2O_2 (50 µl 3 % H_2O_2) und 10 µl HCOOH (100 %) versetzt. Die Mischung wird 12 h bei 50° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird mit 5 ml H_2O verdünnt und am Rotationsverdampfer eingeengt.

In Abb. 67 sieht man den dünnschichtchromatographischen Vergleich der Oxidationsprodukte von Met-Enkephalin mit PAS und H_2O_2. Da mit PAS nur ein Hauptprodukt entsteht (wahrscheinlich Met-Enkephalinsulfon) gegenüber zwei Produkten mit H_2O_2 (wahrscheinlich Met-Enkephalinsulfon und -sulfoxid) wird die Oxidation mit PAS vorgezogen. Das Nebenprodukt nach Oxidation mit PAS (R_f = 0.42) ist noch nicht identifiziert, stellt aber vermutlich ein am Tyrosinrest des Enkephalin oxidiertes Produkt dar. Auch bei Oxidation von Leu-Enkephalin wird ein Nebenprodukt beobachtet.

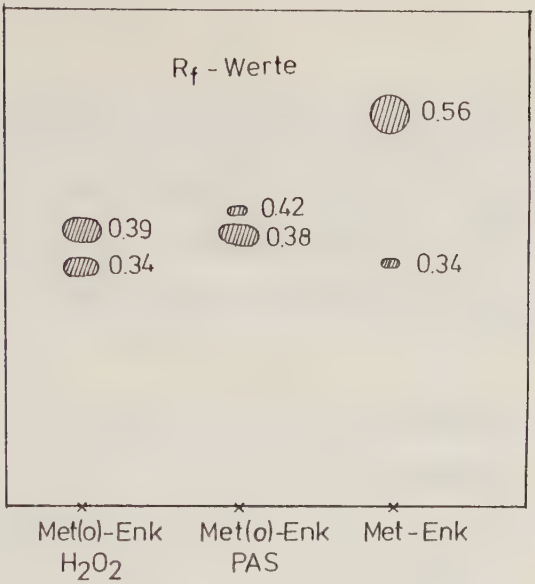


Abb. 67. DC von Met-Enkephalin und seinen Oxidationsprodukten.
Laufmittel: 1-BuOH: AcOH:H_2O = 60:15:25 ($^v/v$), Laufzeit 5 h. Auftrag: Je 15 nmol. Die Platte wurde mit Fluram besprüht.

VII. 5. Behandlung mit Jodchlorid

Die Reaktion wird nach (85) durchgeführt.

10 µl JCl (26.5 mg) werden in ein vorgewogenes Gläschen pipettiert und in 1300 µl Methanol gelöst).

50 pmol Leu-Enkephalin (50 µl 1 µM-Lösung) bzw. 50 µl Extrakt werden in Eppendorfgefäßen im Eis mit 100 µl 15 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.4, versetzt und gemischt. 50 µl JCl-Lösung (≙ 1.0 mg) werden in Portionen von 10 µl innerhalb von 10 min zugegeben. Zwischendurch wird am Vortex-Mixer gemischt. Anschließend wird unter gelegentlichem Mischen noch 30 min im Eis inkubiert. Zur

Zerstörung überschüssigen Reagenzes werden 30/ul 1 M Natriumthiosulfat-Lösung zugegeben. Die Mischung wird weitere 10 min im Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand eingefroren oder gleich getestet. Die Kontrollen erhalten die entsprechende Menge reinen Methanols.

VII. 6. Behandlung mit Ninhydrin

Benötigte Lösungen:

a.) 21 mg Citronensäure in 200/ul 1 M NaOH lösen und mit H_2O auf 500/ul bringen (=0.2 M Citrat, pH 5)

b.) 1 M Threonin (11.9 mg/100/ul)

Je 1 mg Ninhydrin (= 5.6/umol) wird in Eppendorfreaktionsgefäße eingewogen und 80/ul Citratlösung , sowie 10/ul H_2O bzw. Probe zugegeben. Die Gefäße werden verschlossen und , mit Gewichten beschwert, 8 - 9 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Zur Zerstörung überschüssigen Reagenzes wird 10/ul 1 M Threoninlösung zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Nach Neutralisation und Zentrifugation werden die Proben eingefroren oder getestet.

VII. 7. Behandlung mit Fluram

Fluram (= Fluorescamin) wird in solcher Konzentration in Aceton gelöst, daß 3 mg (≙ 11/umol) in 30/ul enthalten sind. Diese werden in Eppendorfgefäßen zu 10/ul H_2O bzw. Probe und 80/ul H_2O gegeben. Die Proben werden am Vortex-

Mixer gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 1 M Threoninlösung wird weitere 15 min inkubiert. Die Proben werden eingefroren oder - nach Zentrifugation - gleich getestet. Besser ist es, die Proben vorher zur Entfernung des Acetons einzuengen und dann in 0.05 M Tris•HCl, pH 7.4 (25° C), aufzunehmen.

VII. 8. Behandlung mit Diazomethan

Die Reaktion erfolgt nach (239). Die Diazomethan-Lösung wurde freundlicherweise von E. Förster, MPI für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt. Diazomethan ist in Diethylether gelöst und wird in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Rundkolben bei -20° C aufbewahrt.

Die wäßrigen Proben werden in Rundkolben pipettiert und zur Trockene eingeengt (Rotationsverdampfer bzw. Lyophilisator). Der Rückstand wird in 1 ml Methanol:H_2O = 10:1 (v/v) aufgenommen. In 50 µl-Portionen wird unter Schütteln so lange Diazomethanlösung zugegeben, bis schwache Gelbfärbung bleibt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und die Proben in 100 µl 0.05 M Tris•HCl, pH 7.4 (25° C), aufgenommen und gegebenenfalls neutralisiert.

VII. 9. Behandlung mit Jodessigsäure

Von einer 0.1 M Jodessigsäurelösung in H_2O werden 10 µl zu 90 µl Probe gegeben und die Mischung in Eppendorfgefäßen 30 min bei 37° C inkubiert. Nach Neutralisation werden die Proben eingefroren oder getestet.

VII. 10. Behandlung mit Dithiothreitol

Von einer 1 M wäßrigen Lösung von DTT werden 5 µl zu 50 µl Probe gegeben. Die Mischung wird 60 min im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Anschließend werden die Proben eingefroren oder gleich im cyclo AMP-Test getestet. Nach (240) hat die unter den Testbedingungen erreichte Endkonzentration an DTT keinen meßbaren Effekt auf die Zellen. Der Überschuß an DTT in den Proben wird deshalb nicht entfernt.

VII. 11. Behandlung mit Säure und Lauge

20 - 100 µl Probe werden mit 500 µl 1 M HCl oder 1 M NaOH versetzt und 15 min in Eppendorfgefäßen im kochenden Wasser belassen. Anschließend werden die Lösungen eingefroren und in den Eppendorfgefäßen lyophilisiert. Die Rückstände werden in 250 µl H_2O aufgenommen, neutralisiert (mit 2 M HCl oder 2 M NaOH) und auf 500 µl aufgefüllt und getestet oder eingefroren.

VII. 12. Durchführung einer Dialyse kleiner Volumina

Der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes wird vollständig entfernt. 100 - 200 µl Probe werden einpipettiert und das Gefäß mit einem kleinen Stückchen nassen, aufgefalteten Dialyseschlauchs verschlossen. Die Membran wird dabei (wie bei einem Marmeladeglas) mit einem Gummiring befestigt und abgedichtet. Das Gefäß wird nun umgedreht, die Probe vollständig auf die Membran gebracht (evtl. durch

Klopfen am Gefäßboden) und mittels einer Klammer in ein Becherglas mit 1 l Dialysepuffer (0.05 M Tris·HCl, pH 7.4 (25° C)) gehängt. Die Membran taucht in den Puffer ein. Unter leichtem Rühren des Puffers wird im Kühlraum 24 h dialysiert. Anschließend wird lyophilisiert und in Wasser aufgenommen.

VIII. Reaktionen zur Strukturaufklärung des enkephalin-ähnlichen Materials aus Hybridzellen

VIII. 1. Dansylierung von Peptiden

Benötigte Reagentien und Lösungsmittel:

a.) Dansylchlorid in Aceton (2.5 mg/ml)

b.) ^{3}H-Dansylchlorid in Benzol (getrocknet)

c.) Dimethylformamid (destilliert)

d.) Pyridin dest. und hochreines H_2O (Spezialwasser für die HPLC)

e.) Benzol

f.) HCOOH

g.) AcOH

Die Dansylchloridlösung wird jedesmal frisch hergestellt. ^{3}H-DnsCl (gelöst in Pentan und bei -140° C gelagert) wird nach Öffnung der Ampulle durch Begasen mit N_2 zur Trockene eingeengt und in getrocknetem Benzol aufgenommen. DMF wird vor der Benutzung mittels einer Quickfit-Apparatur über P_2O_5 (2 g/20 ml) im Vakuum destilliert. Alle benützten Glasgefäße sind mit Chromschwefelsäure

gereinigt. Restliches ^{3}H-DnsCl wird wieder (in benzolischer Lösung) bei -140^{o} C gelagert.

Aus einem langen Glasrohr (2 mm Durchmesser) werden 3 - 4 cm lange Stückchen abgeschnitten und diese an einem Ende über dem Bunsenbrenner möglichst so zugeschmolzen, daß ein runder Gefäßboden entsteht (schnellere Trocknung der Proben ist möglich). Die experimentelle Durchführung der Dansylierung erfolgt in Anlehnung an (241) und umfaßt folgende Schritte:

a.) Proben (5 - 10 µl) in Gläschen einpipettieren, in Eppendorfgefäße stellen und zentrifugieren.

b.) Proben am Speed vac Concentrator trocknen.

c.) Zu Proben, die mit radioaktivem DnsCl umgesetzt werden sollen, 1 - 10 µCi (1 µCi ≙ 28 pmol) ^{3}H-DnsCl in Benzol pipettieren und im Speed vac Concentrator trocknen.

d.) Alle Proben in 20 µl DMF aufnehmen und durch Klopfen und Schütteln mischen.

e.) In die Gläschen mit radioaktivem DnsCl 20 µl Aceton pipettieren. Zu den restlichen Gläschen, die mit kaltem DnsCl umgesetzt werden, 20 µl DnsCl-Lösung in Aceton hinzufügen.

f.) Alle Gläschen mit Parafilm verschließen, in Eppendorfgefäßen, die ca. 0.5 ml 37^{o}C warmes Wasser enthalten, bei 37^{o}C im Wasserbad 3 h im Dunkeln inkubieren.

g.) Proben anschließend im Speed vac Concentrator trocknen.

h.) Proben in 5 - 10 µl 50 % Pyridin (dest., s. VI. 2.5., S. 233) aufnehmen.

i.) Aus Polyamidfolien 5 x 5 cm große Platten mit eigens dafür reservierter Schere schneiden. Folien nur mit Plastik-Handschuhen anfassen.

j.) Mit einer 1 µl-Kapillare 1 µl jeder Probe in die rechte untere Ecke 7 mm vom Rand auftüpfeln (ca. 50 - 60 mal/µl). Einen Fön dabei laufen lassen (kalt).

k.) Je ein Becherglas (250 ml) mit 3 ml 5 % HCOOH bzw. 3 ml einer Mischung aus Benzol:AcOH = 3:1 (v/v) füllen und mit Aluminiumfolie verschließen.

l.) Platten in 5 % HCOOH chromatographieren, bis das Lösungsmittel gerade den oberen Rand erreicht. Zur Sicherheit am Anfang eine Probeplatte chromatographieren.

m.) Platten gut trocknen (mittels Fön in einem Becherglas).

n.) Platten um 90° verdreht im zweiten Laufmittel chromatographieren und trocknen.

o.) Flecken unter der UV-Lampe (Schutzbrille!) anschauen, auf Transparentpapier mittels Bleistift übertragen.

p.) Radioaktive Flecke durch Autoradiographie nachweisen.

Die Chromatographien müssen so durchgeführt werden, daß kein Lufzug für ungleiche Temperaturen in den Bechergläsern sorgt. Die Bechergläser sind mit Aluminiumfolie verschlossen. Überstülpen eines zweiten größeren Becherglases über das erste mindert Temperaturschwankungen und damit schiefe Lösungsmittelfronten auf den Platten.

Als Standard werden je 8 nmol Met- bzw. Leu-Enkephalin dansyliert und vor der Chromatographie in 15 µl Pyridin (50 %) aufgenommen.

VIII. 2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Sie erfolgt nach (242) wie folgt:

a.) Dansylierung nach obiger Vorschrift bis Schritt g oder h durchführen und gegebenenfalls (bei h) trocknen. Hydrolysen entweder in denselben Gläschen durchführen oder, falls nötig, mittels sauberer, silanierter, ausgezogener Pasteurpipette in andere Röhrchen derselben Art überführen.

b.) Trockene Rückstände mit 50 µl 6 M HCl (destilliert) versetzen, mit N_2 überblasen und über einer kleinen Flamme abschmelzen (erwärmen und mit Tiegelzange zusammendrücken).

c.) Ca. 16 h bei 105° C im Trockenschrank hydrolysieren.

d.) Im Speed vac Concentrator bzw. im Exsiccator (über NaOH) trocknen.

e.) Rückstände in 5 µl 50 % Pyridin aufnehmen.

f.) 1 µl auf Polyamidplatten auftragen (evtl. 1 µl einer Standard-Dansylaminosäurelösung (20 pmol/µl) zusätzlich auftragen).

g.) Je 1 Becherglas (250 ml) mit 3 ml 1.5 % HCOOH und 3 ml einer Mischung Benzol:AcOH = 9:1 (v/v) füllen.

h.) Platten wie in VIII. 1. 1 - p chromatographieren und behandeln.

6 M HCl (13.5 ml konzentrierte HCl + 9 ml H_2O) werden in der Quickfitapparatur über 0.5 g $SnCl_2$ destilliert (236).

VIII. 3. Totalhydrolyse und Dansylierung der Aminosäuren

Die Totalhydrolyse von Peptiden erfolgt genauso wie in VII. 2. a - d beschrieben. Die Weiterverarbeitung geschieht auf folgende Weise:

a.) 10/ul 0.2 M $NaHCO_3$-Lösung, pH 10.0 hinzufügen, mischen und im Speed vac Concentrator trocknen.

b.) 5/ul ^{3}H-DnsCl in Benzol oder 10/ul DnsCl in Aceton einpipettieren und trocknen.

c.) 10/ul einer Mischung aus 1 Teil 0.05 M $NaHCO_3$ pH 10.0 und 3 Teilen Aceton hinzufügen, mischen und im Dunkeln 3 h bei 37°C inkubieren.

d.) Die Proben im Speed vac Concentrator zur Trockene einengen und in 5 - 10/ul 50 % Pyridin aufnehmen.

e.) Weiter verfahren wie unter VIII. 2. f - h beschrieben.

Wenn genügend Probenmaterial vorhanden ist, wird jede der in Frage kommenden Aminosäuren als Standarddansylaminosäure (bei Leu-Enkephalin: Tyr, Gly, Phe, Leu) einzelnen mit einem Aliquot der Probe chromatographiert. Die Identifizierung der radioaktiven Dansylaminosäuren aus der Probe ist dadurch sicherer.

VIII. 4. Durchführung der Autoradiographie

Bis zu 20 Polyamidplatten (5 x 5 cm) werden auf einen festen Karton mit Tesafilm befestigt. Der Karton wird mit radioaktiver Tinte (^{3}H-cyclo AMP gemischt mit Dextranblaulösung) an mehreren Stellen eindeutig markiert, um den Film später

richtig zuordnen zu können. In der Dunkelkammer wird bei schwachem Rotlicht ein Blatt (30x24 cm) Spezialfilm für die Autoradiographie von Tritium (Ultrofilm ^{3}H) auf die Polyamidplatten gelegt. Da der Film nur einseitig beschichtet ist, muß auf die richtige Lage geachtet werden. (Beim Betrachten unter Rotlicht glänzt die unbeschichtete Seite, die beschichtete dagegen ist stumpf. Außerdem ist die beschichtete Seite beim Berühren mit einem feuchten Finger klebrig, nicht dagegen die unbeschichtete. Zudem gibt seit kurzem der Hersteller Hinweise auf die richtige Handhabung). Der Film wird in einer Kassette für die Autoradiographie, in der er fest auf die Platten gepreßt wird, 1 - 2 Wochen belichtet. Anschließend wird entwickelt (3 - 5 min), fixiert (30 min) und gewässert (30 min). Der Film wird an der Luft getrocknet. Auf keinen Fall im Trockenschrank trocknen, da sich die Emulsionsschicht ablöst!

IX. Indirekte Immunfluoreszenz

IX. 1. Indirekte Immunfluoreszenz an fixierten Zellen

Die Immunfluoreszenz an fixierten Zellen wird genau nach (205) durchgeführt. Bei Verwendung von Hybridzellen 108CC15 müssen die Deckgläschen, auf denen die Zellen für die Immunfluoreszenz gezüchtet werden, mit Polyornithin beschichtet werden (bessere Anhaftung der Zellen). Dazu werden 5 - 7 hitzesterilisierte Deckgläschen mit sterilem

Siliconfett unter sterilen Bedingungen auf den Boden einer Petrischale (60 oder 85 mm Durchmesser) angeklebt. Man gibt 5 bzw. 10 ml einer sterilen Polyornithinlösung (0.1 mg/ml in 0.15 M Boratpuffer, pH 8.4 nach (243)) zu und läßt 1 h bei Raumtemperatur stehen. Nach Absaugen der Lösung wird mit 5 bzw. 10 ml Kulturmedium gewaschen und ein Inokulum an Zellen angesät. Nach 4 - 5 Tagen in Kultur wird die Immunfluoreszenz nach Vorschrift durchgeführt. Um die Haftung der Zellen zu erhöhen, wird Ca^{2+}-/Mg^{2+}-haltiges (0.14 g $CaCl_2$ + 0.1 g $MgCl_2$/1) PBS pH 7.2 verwendet.

IX. 2. Indirekte Immunfluoreszenz an Zellschnitten

Hybridzellen werden in 800 ml-Kulturkolben gezüchtet und die Zellen mit Medium Puck's D 1/Glu/Suc 2 x gewaschen, durch Inkubation mit diesem Medium abgelöst und zentrifugiert. Das Sediment wird (bei isotonischer Fixation) in 20 ml einer 1 % Lösung von Formaldehyd in 15 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, aufgenommen (Osmolalität der Lösung ca. 330 mOsmol/1) und 2 h im Eis fixiert. Alternativ wird mit einer 4 % Formaldehydlösung fixiert (1120 mOsmol/1) . Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und in 20 ml Holt'scher Lösung (244) vorsichtig resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wird die Lösung abgesaugt und das Sediment nochmals in 20 ml Holt'scher Lösung resuspendiert und weitere 2 h inkubiert. Nach Zentrifugation wird das Sediment in kleinem Volumen (1 ml) Holt'scher Lösung auf-

genommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Das Sediment wird in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Holt'sche Lösung besteht aus 30 g Saccharose und 1g Gummi arabicum ad 100 ml H_2O und wurde von Herrn Dr. Kugler zur Verfügung gestellt. Die Gefrierschnitte wurden freundlicherweise erst von Herrn Prof. Dr. Gossrau, später von Herrn Dr. Kugler, Anatomisches Institut, Würzburg, angefertigt. Das Zellsediment wird dazu in gefrorenem Zustand auf einem Träger in eine frische Mäuse- oder Rattenleber eingebettet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe eines Kryotoms werden dann nacheinander 10 µm dicke Scheibchen abgeschnitten und auf Objektträger übertragen. Die Schnitte werden entweder gleich verwendet oder werden - ohne zwischendurch aufzutauen - in einen Tiefkühlschrank transportiert.

Um den Schnitt werden mit einem Glasschneider Rillen gezogen, um das Verlaufen der Seren zu vermeiden. Nach Trocknen des Schnitts an der Luft wird mit primärem Antiserum bei 4^{o} C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt gemäß Ref (205).

IX. 3. Präadsorption der Seren an Hybridzellen

Die Präadsorption erfolgt nach Angaben von K. Hallermayer. Für jedes zu adsorbierende Serum werden 2 Petrischalen (60 mm Durchmesser) mit Hybridzellen benötigt. Je 1 Petrischale (für Normal- und Antiserum) wird 2 mal mit je 4 ml PBS ($+Ca^{2+}/Mg^{2+}$) gewaschen. Anschließend werden die

Zellen mit 3 ml Methanol (-20^{o} C) für 4 min und mit 3 ml Aceton (-20^{o} C) für 1 min fixiert. Die Platten schwimmen während der Fixation auf trockeneisgekühltem EtOH. Nach Absaugen des Acetons und Trocknen der Zellen an der Luft werden 500 µl Serum zugesetzt, gut verteilt und 30 min im Brutschrank inkubiert. In der Zwischenzeit werden zwei weitere Petrischalen mit Hybridzellen genauso wie oben bearbeitet. Diese Platten werden aber nach der Acetonbehandlung (5 min bevor sie benötigt werden) mit 5 ml PBS für 5 min gewaschen. PBS wird abgesaugt und die nun schon inkubierten Seren von der ersten Platte auf die zweite überführt und weitere 30 min inkubiert. Anschließend werden die Seren in Eppendorfgefäße überführt und benützt oder eingefroren.

X. Sonstige Methoden

X. 1. Extraktion von Serum

100 ml Serum werden mit 100 ml kalter 20 % TCA versetzt und 30 min im Eis stehen gelassen. Nach Zugabe von ^{3}H-Leu-Enkephalin (ca. 30 000 cpm) wird der Niederschlag in der Sorvall-Zentrifuge im Rotor SS34 bei 10 000 UpM 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird im Scheidetrichter 5 mal mit je 300 ml wassergesättigtem Diethylether zur Entfernung der TCA ausgeschüttelt. Der pH-Wert sollte dann zwischen 3.5 und 4 liegen. Nachdem der Ether mit N_2 ausgetrieben wurde, wird lyophilisiert und der Rückstand nach VI. 1. 4 - 15 weiterverarbeitet.

X. 2. Extraktion von serumfreiem Wachstumsmedium

Sollen Opioide aus Wachstumsmedium angereichert werden, so wird dazu eines ohne Phenolrotzusatz verwendet. Ein solches Medium wird aus den Einzelbestandteilen gemäß den Mengenangaben des Herstellers selbst hergestellt. Phenolrot adsorbiert nämlich stark an Bio-beads und eluiert nur sehr langsam von Sephadex LH-20.

Das zu untersuchende Medium wird nach Zusatz von ca. 6.5×10^4 dpm ^{3}H-Leu-Enkephalin lyophilisiert und anschließend über "große" Bio-beads-Säulen (17 ml Füllung) chromatographiert. Diese Säulen werden mit etwa den doppelten Volumina gewaschen und eluiert wie die "kleinen" (s. VI. 1.6). Die weitere Aufarbeitung der Medienextrakte erfolgt nach VI. 1. 11 - 15.

X. 3. Spezielle Inkubations- und Wachstumsmedien

Für bestimmte Versuche wurden Medien mit veränderter K^+- und/oder Ca^{2+}-Konzentration benötigt. Die Bestandteile des DMEM-Mediums und Hepes als Puffersubstanz werden deshalb entsprechend selbst eingewogen. Es wird eine Stammlösung ohne NaCl, KCl, $CaCl_2$, Ca-Panthotenat, $NaHCO_3$ und Phenolrot hergestellt. Diese Lösung wird nur in Plastikgefäßen aufbewahrt, um Kontamination mit Ca^{2+} aus Glas zu vermeiden. Je nach Bedarf werden die entsprechenden Salze eingewogen und der pH-Wert mit 5 M NaOH auf pH 7.4 eingestellt, sowie die Osmolalität gemessen (sie soll zwischen 320 und 340 mOsmol/1 betragen). Bei Ca^{2+}-freiem Medium

wird Ca-Panthotenat durch Na-Panthotenat ersetzt. Bei erhöhter K^+-Konzentration (56 mM) wird die Na^+-Konzentration um 50 mM erniedrigt.

Zusätze zum Wachstumsmedium, wie Hormone und Drogen, werden bei kleinen Volumina (1 - 2 ml) in wäßriger Lösung steril in konzentrierter Form zu 1 l Wachstumsmedium gegeben. Ist eine solche Konzentration nicht möglich, wird das betreffende Hormon in DMEM gelöst, z. B. Dexamethason zu einer 50 µM Lösung (über Nacht bei Raumtemperatur oder 3 - 4 h bei 37° C rühren) und bis zu 20 ml zu 1 l DMEM/FCS/HAT zugegeben. Übersteigt das zugegebene Volumen 20 ml, so wird die entsprechende Menge DMEM vorher abgenommen und die Lösung, FCS und HAT erst anschließend zugegeben.

X. 4. Präparation und Extraktion von Tumoren

Tumoren aus Hybridzellen werden nach (141) erzeugt. Athymische "nackte Mäuse" von verschiedenen Stämmen (C 57, Balb c, CH3) werden benutzt. Je 10^6 lebende Hybridzellen (P 13 - P 20) in 0.2 ml DMEM werden subcutan auf jede Seite der Maus unter leichter Ethernarkose injiziert. Alter der Mäuse etwa 3 - 5 Wochen. Nach 2 - 3 Wochen werden die Mäuse durch Ether getötet, die Tumoren möglichst ohne Bindegewebe rasch herauspräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

8 - 10 g Tumoren (in gefrorenem Zustand gewogen) werden portionsweise in insgesamt 60 ml 8 % TCA mit dem Potter-

Elvehjem-Homogenisator homogenisiert und das Homogenat in der Sorvall-Zentrifuge (Rotor SS34) 10 min bei 10 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird wie bei X.1 mit Diethylether ausgeschüttelt, lyophilisiert und weiterverarbeitet (z. B. Chromatographie an Biogel P 4).

X. 5. Extraktion von Rattengehirnen

Die Gehirne von 2 - 4 Ratten (Wistar ca. 200 - 250 g) werden präpariert, gewogen und nacheinander in je 10 ml 8 % TCA im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter X. 4. für die Tumoren beschrieben.

X. 6. Präparation von Rattengehirnmembranen

Die Gehirne von 4 Ratten (Wistar 200 - 250 g) werden präpariert, gewogen und im Kühlraum im Potter-Elvehjem-Homogenisator in 20 ml 0.05 M Tris•HCl, pH 7.4 (25° C), bei höchster Motordrehzahl mit etwa 20 Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Das Homogenat wird auf zwei 50 ml-Zentrifugenbecher verteilt, 20 - 30 ml 0.05 M Tris•HCl, pH 7.4 (25° C), werden dazugegeben und das verdünnte Homogenat wird 10 min bei 900 g zentrifugiert. Weiterverarbeitet wird wie unter IV. 2.1. 4.- 9. für Hybridzellen beschrieben. Das Sediment nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird in 30 ml 0.05 Tris•HCl, pH 7.4 (25° C), aufgenommen.

X. 7. Inkubation von Hybridzellen mit radioaktiven Aminosäuren

^{3}H-Leucin und ^{35}S-Methionin werden in die benötigte Menge an selbst hergestelltem DMEM ($NaHCO_3$-gepuffert, HAT) pipettiert, dem Methionin und Leucin fehlen. Für längere Inkubation (z. B. 6 h) wird das radioaktive Medium über Sterilfiltrationseinheiten sterilisiert.

Das Wachstumsmedium wird abgesaugt, der Zellrasen 1 x mit 10 ml (für Zellen in Petrischalen mit 85 mm Durchmesser) DMEM ohne Methionin und Leucin gewaschen und 5 ml radioaktives Medium wird zugegeben. Die Zellen werden für die gewünschte Zeit im Brutschrank inkubiert. Bei Bedarf werden (für ein "pulse-chase"-Experiment) nach einer bestimmten Zeit je 500 µl einer gegenüber der Normalkonzentration im DMEM 10-fach konzentrierten Leucin- bzw. Methionin-Lösung in DMEM zugegeben. Nach der Inkubation werden die Zellen 3 mal mit je 5 ml D1/Glu/Suc gewaschen, mit 1 M AcOH extrahiert und aufgearbeitet wie unter VI. 1. 3 - 15 beschrieben. Die partiell gereinigten Extrakte werden mittels HPLC weitergereinigt.

Die Radioaktivität wird unter Doppelmarkierungsbedingungen im Tricarb 3385 gezählt. ^{35}S-Methionin wird im ^{14}C-Kanal gemessen. Die Zählfenster werden so eingestellt, daß im ^{14}C-Kanal keine Tritium-Impulse gezählt werden (Einstellung im ^{3}H-Kanal: Fenster A - B, 50 - 500 Skalenteile, im ^{14}C-Kanal: Fenster C - D, 170 - 1000 Skalenteile). Unter diesen Bedin-

gungen beträgt die Zählausbeute für Tritium 46 %, für ^{35}S im ^{14}C-Kanal nur ca. 13 %. 31 % der im gesamten ^{14}C-Fenster gemessenen Impulse von ^{35}S-Methionin werden unter Doppelmarkierungsbedingungen im ^{3}H-Kanal gemessen.

X. 8. Proteinbestimmung

Protein wird nach der Methode von Lowry (245) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

X. 9. Dialyse von FCS

100 ml FCS werden in einem Dialyseschlauch bei 4°C erst 4 h, dann 14 h und nochmals 10 h gegen jeweils 10 l deionisiertes Wasser dialysiert. Anschließend wird es durch Druckfiltration und Sterilfiltration sterilisiert.

X. 10. Adenylatcyclasetest

Die Adenylatcyclasetests (246) wurden freundlicherweise von F. Propst durchgeführt.

D. ZUSAMMENFASSUNG

An permanenten neuronalen Zell-Linien, hauptsächlich aber an Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen wurden Studien zum Gehalt an Opioiden und zur Regulation des Opioidgehalts durchgeführt.

1.) Als Voraussetzung dieser Studien wurde der biologische Test für Opioide, der über die Regulation des cyclo AMP-Spiegels in Hybridzellen läuft, miniaturisiert. Als zweites Testsystem wurde ein Rezeptorbindungstest mit Hybridzellmembranen etabliert. Ein radioimmunologischer Test (RIA) diente als drittes Testsystem. Die Spezifität des Antiserums wurde über das bereits Bekannte hinaus weiter charakterisiert.

2.) Außer Enkephalinen und Endorphinen senken auch andere endogene Gehirn-Opioide in Anwesenheit des die cyclo AMP-Konzentration erhöhenden Hormons PGE_1 den cyclo AMP-Spiegel in den Hybridzellen ab. Sie wirken über die Opioidrezeptoren dieser Zellen. Diese Opioide konkurrieren mit ^{3}H-Leu-Enkephalin um die Bindung an Opioidrezeptoren in Hybridzellmembranen. Sie können also an die Opioidrezeptoren der Hybridzellen binden.

3.) Dermorphine, Opioidpeptide aus Froschhaut mit einem D-Alanin in ihrer Sequenz, können wie die anderen Opioide auch, über Opioidrezeptoren den cyclo AMP-Gehalt in den

Hybridzellen regulieren. Das nicht natürliche L-Alanin-Analogon ist nahezu völlig inaktiv. Dermorphine hemmen die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Opioidrezeptoren in Hybridzellen, die L-Alanin-Verbindung ist nur wenig aktiv. Die Dermorphine sind im Hybridzellsystem verglichen mit den Enkephalinen mindestens eine Größenordnung weniger potent.

4.) ß-Casomorphin-(1-5) und -(1-4), Opioidpeptide aus Casein, wirken bis zu einer Konzentration von 1 µM nicht auf Hybridzellen ein.

5.) Somatostatin konkurriert weder mit ^{3}H-Naloxon noch mit ^{3}H-Leu-Enkephalin um die Bindung an Opioidrezeptoren. Die Wirkung von Somatostatin auf die Hybridzellen kann also nicht von den Opioidrezeptoren, sondern muß durch spezifische Somatostatinrezeptoren vermittelt werden.

6.) Saure Rohextrakte aus Hybrid- und Gliomazellen senken den hormonell erhöhten cyclo AMP-Spiegel in Hybrid- und Glioma-Zellen ab. Der Opioidantagonist Naloxon beeinflußt die Wirkung auf die Hybridzellen nicht. Die Extrakte hemmen aber die Bindung von ^{3}H-Leu-Enkephalin an Opioidrezeptoren in Hybridzellmembranen und an spezifische Antikörper.

7.) Bei der gelchromatographischen Reinigung von Hybridzellextrakten erhält man mindestens sechs Fraktionen, die in

Hybridzellen den durch PGE_1 erhöhten cyclo AMP-Spiegel absenken. In einer Fraktion ist Acetylcholin enthalten. Aus den Messungen ergeben sich noch keine Hinweise auf die Anwesenheit von Opioiden. Einige der Fraktionen können auch in Gliomazellen den cyclo AMP-Spiegel erniedrigen. Die auf den Hybridzellen aktivsten Fraktionen wurden mit gruppenspezifischen Reagentien, Proteasen und anderen Enzymen behandelt. Einige der aktiven Komponenten sind keine Peptide. Extrakte aus Gliomazellen, aus fötalem Kälberserum und aus Rattengehirn enthalten ähnliche Faktoren.

8.) Kombinierte Reinigung von Hybridzellextrakten mittels Adsorptionschromatographie an Bio-beads und Chromatographie an Sephadex LH-20 führt zur Anreicherung von Opioiden. Mit allen 3 Testsystemen werden übereinstimmende Mengen gefunden. Diese Opioide sind Peptide und sind in ihrem Verhalten gegenüber Proteasen den Enkephalinen ähnlich.

9.) Weitere Reinigung der Extrakte mittels Hochleistungsflüssigkeits- und Dünnschichtchromatographie, sowie Hochspannungspapierelektrophorese liefert jeweils 2 Fraktionen mit Opioidaktivität, die sich wie Met- und Leu-Enkephalin verhalten. Das Verhältnis von Met- zu Leu-enkephalin-ähnlichem Material ist 3 bis 4 : 1.

10.) Unter gewissen Bedingungen scheint es möglich zu sein, größere Mengen an Opioiden aus Hybridzellen völlig zu reinigen. Das Leu-enkephalin-ähnliche Material verhält sich - als intaktes Peptid sowie nach Totalhydrolyse - nach Dansylierung wie authentisches Leu-Enkephalin. Sowohl in der Met- wie in Leu-Enkephalinfraktion ist nach intensiver Reinigung eines Großansatzes eine Substanz enthalten, die sich nach Dansylierung und 2-dimensionaler Chromatographie identisch wie das jeweilige Enkephalin verhält.

11.) In anderen neuronalen Zell-Linien, in polyploiden Gliomazellen, sowie gelegentlich in pseudo-diploiden Gliomazellen ist ebenfalls Opioidaktivität vorhanden. In einer Fibroblasten-Linie, sowie im fötalen Kälberserum wird keine Opioidaktivität gefunden.

12.) Der Opioidgehalt in den Hybridzellen ist zum Teil starken Schwankungen unterworfen. Bei erhöhter Temperatur im Brutschrank (38^{o} C) sinkt der Gehalt stark ab, bei erhöhter Zelldichte steigt er stark an.

13.) In Gegenwart von Glucocorticoiden (z. B. Dexamethason) ist der Opioidgehalt in den Hybridzellen 3 - 4 fach erhöht. Die maximale Induktion erhält man bei 1 µM Dexamethason und einer Einwirkungsdauer von mindestens 24 h. Andere Steroidhormone, wie Progesteron und Testosteron haben keinen Einfluß.

14.) Durch Depolarisation, sowie durch Kyotorphin wird der intrazelluläre Opioidgehalt geringfügig erniedrigt. Die Freisetzung durch Kyotorphin ist nicht Ca^{2+}-abhängig; bei der Depolarisation ist die Ca^{2+}-Abhängigkeit noch nicht geklärt, da bei Abwesenheit von Ca^{2+} der Opioidgehalt über den Kontrollwert hinaus erhöht ist.

15.) In Hybridzellextrakten sind hochmolekulare Faktoren enthalten, die in Hybrid- und Gliomazellen die hormonell ausgelöste Erhöhung des cyclo AMP-Spiegels verhindern. Sie tun dies nicht in Primärkulturen aus Gehirnen neugeborener Mäuse. Sie hemmen die Aktivität der durch PGE_1 stimulierten Adenylatcyclase in Hybridzellen. Es sind aber wahrscheinlich auch Substanzen enthalten, die die Adenylatcyclaseaktivität stimulieren. Die Wirksamkeit dieser Faktoren auf Hybridzellen wird durch die Anwesenheit α-adrenerger und cholinerger Antagonisten sowie des Opioidantagonisten Naloxon nicht beeinflußt. Längere Behandlung mit Pepsin zerstört die hemmende Aktivität vollkommen. Die Faktoren sind offensichtlich Proteine. Trotzdem geht bei Hitzebehandlung keine Aktivität verloren. Ein kleiner Teil der Aktivität verschwindet nach Dialyse. Der größte Teil der Aktivität wird bei pH 7.5 nicht von einer DEAE-Anionenaustauschersäule adsorbiert und eluiert von einer Sephadex G-75 Säule im Ausschlußvolumen.

Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen synthetisieren also Opioidpeptide, die dem Met - und Leu-Enkephalin sehr ähnlich, wahrscheinlich aber sogar mit ihnen identisch sind. Diese Zell-Linie ist damit die erste, von der dies bekannt ist. Die Konzentration an enkephalin-ähnlichem Material ist in den Zellen im Vergleich zu der im Rattengehirn gering. Es bedarf noch eingehender und intensiver Studien, um zu sehen, wie die Biosynthese der Opioidpeptide in den Zellen abläuft und inwieweit sie durch weitere, noch nicht untersuchte, äußere Bedingungen reguliert werden kann.

D. LITERATURVERZEICHNIS

1.) F. Sertürner (1803).

2.) Laurent (1848).

3.) M. Mackay und D.C. Hodgkin, J. Chem. Soc. (1955) 3261 - 3267.

4.) L. Terenius, Acta Pharmacol. Toxicol. 32 (1973) 317 - 320.

5.) E.J. Simon, J.M. Hiller und I. Edelman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973) 1947 - 1949.

6.) C.B. Pert und S.H. Snyder, Science 179 (1973) 1011 - 1014.

7.) P. Schubert, V. Höllt und A. Herz, Life Sci. 16 (1975) 1855 - 1856.

8.) C.B. Pert, M.J. Kuhar und S.H. Snyder, Life Sci. 16 (1975) 1849 - 1853.

9.) M.J. Kuhar, C.B. Pert und S.H. Snyder, Nature 245 (1973) 447 - 450.

10.) J.M. Hiller, J. Pearson und E.J. Simon, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 6 (1973) 1052 - 1062.

11.) C.B. Pert, M.J. Kuhar und S.H. Snyder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 3729 - 3733.

12.) J. Pearson, L. Brandeis, E.J. Simon und J. Hiller Life Sci. 26 (1980) 1047 - 1052.

13.) D.J. Mayer, T.L. Wolfle, H. Akil, B. Carder und J.C. Liebeskind, Science 174 (1971) 1351 - 1354.

14.) H.W. Kosterlitz und A.J. Watt, Br. J. Pharmacol. Chemother. 33 (1968) 266 - 276.

15.) J. Hughes, H.W. Kosterlitz und F.M. Leslie Br. J. Pharmacol. 53 (1975) 371 - 381.

16.) W.R. Martin, C.G. Eades, J.A. Thompson, R.E. Huppler und P.E. Gilbert, J. Pharmacol. Exp. Ther. 197 (1976) 517 - 532.

17.) J.A.H. Lord, A.A. Waterfield, J. Hughes und H.W. Kosterlitz, Nature 267 (1977) 495 - 499.

18.) K.L. Gilliard und A.E. Takemori, J. Pharmacol. Exp. Ther. 207 (1978) 884 - 891.

19.) A. Cowan, E.B. Geller und M.W. Adler, Science 206 (1979) 465 - 467.

20.) K.J. Chang und P. Cuatrecasas, J.Biol. Chem. 254 (1979) 2610 - 2618.

21.) K.J. Chang, B.R. Cooper, E. Hazum und P. Cuatrecasas, Molec. Pharmacol. 16 (1979) 91 - 104.

22.) R.R. Goodman, S.H. Snyder, M.J. Kuhar und W.S. Young III, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(1980) 6239 - 6243.

23.) A. Herz, J. Bläsig, H.M. Emrich, C. Cording, S. Pirée, A. Kölling und D.v. Zerssen, Adv. Biochem. Psychopharmacol. 18 (1978) 333 - 339.

24.) G. Urca, H. Frenk, J.C. Liebeskind und A.N. Taylor, Science 197 (1977) 83 - 86.

25.) L. Stein und J.D. Belluzzi, Fed. Proc. 38 (1979) 2468 - 2472.

26.) D.R. Curtis und R.W. Ryall, Exp. Brain Res. 2 (1966) 66 - 80.

27.) R.P. Ahlquist, Am. J. Physiol. 153 (1948) 586 - 600.

28.) J.W. Black, W.A.M. Duncan, C.J. Durant, C.R. Ganellin und E.M. Parsons, Nature 236 (1972) 385 - 390.

29.) D. van Calker, M. Müller und B. Hamprecht, J. Neurochem. 33 (1979) 999 - 1005.

30.) J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, L.A. Fothergill, B.A. Morgan und H.R. Morris, Nature 258 (1975) 577 - 579.

31.) N. Ling, R. Burgus und R. Guillemin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 3942 - 3946.

32.) R. Guillemin, N. Ling und R. Burgus, C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D. 282 (1976) 783 - 785.

33.) A.F. Bradbury, D.G. Smyth, C.R. Snell, N.J.M. Birdsall und E.C. Hulme, Nature 260 (1976) 793 - 795.

34.) B.M. Cox, A. Goldstein und C.H. Li, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 1821 - 1823.

35.) C.H. Li und D. Chung, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 1145 - 1148.

36.) N.G. Seidah, M.Lis, C. Gianoulakis, P. Schiller und M. Chrétien, Lancet I (1976) 1017.

37.) K. Kangawa, H. Matsuo und M. Igarashi, Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 (1979) 153 - 160.

38.) A. Goldstein, S. Tachibana, L.I. Lowney, M. Hunkapiller und L. Hood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 6666 - 6670.

39.) K. Mizuno, N. Minamino, K. Kangawa und H. Matsuo, Biochem. Biophys. Res. Commun. 95 (1980) 1482 - 1488.

40.) W.-Y. Huang, R.C.C. Chang, A.J. Kastin, D.H. Coy und A.V. Schally, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 6177 - 6180.

41.) J. Rossier, Y. Audigier, N. Ling, J. Cros und S. Udenfriend, Nature 288 (1980) 88 - 90.

42.) C.H. Li, L. Barnafi, M. Chrétien und D. Chung, Nature 208 (1965) 1093 - 1094.

43.) R.E. Mains und B.E. Eipper, J. Biol. Chem. 254 (1979) 7885 - 7894.

44.) S. Nakanishi, A. Inoue, T. Kita, M. Nakamura, A.C.Y. Chang, S.N. Cohen und S. Numa, Nature 278 (1979) 423 - 427.

45.) J. Rossier, T.M. Vargo, S. Minick, N. Ling, F.E. Bloom und R. Guillemin, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 74 (1977) 5162 - 5165.

46.) C. Gramsch, V. Höllt, P. Mehraein, A. Pasi und A. Herz, Brain Res. 171 (1979) 261 - 270.

47.) S.J. Watson, H. Akil, Ch.W. Richard III und J.D. Barchas, Nature 275 (1978) 226 - 228.

48.) A. Bayon, W.J. Shoemaker, F.E. Bloom, A. Mauss und R. Guillemin, Brain Res. 179 (1979) 93 - 101.

49.) R.M. Kobayashi, M. Palkovits, R. Miller, K.J. Chang und P. Cuatrecasas, Life Sci. 22 (1978) 527 - 530.

50.) R.V. Lewis, A.S. Stern, S. Kimura, S. Stein und S. Udenfriend , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5018 - 5020.

51.) R.V. Lewis, A.S. Stern, S. Kimura, J. Rossier, S. Stein und S. Udenfriend, Science 208 (1980) 1459 - 1461.

52.) L.J. Larsson, S. Childers und S.H. Snyder, Nature 282 (1979) 407 - 410.

53.) R.J. Miller, K.J. Chang, J. Leighton und P. Cuatrecasas, Life Sci. 22 (1978) 379 - 388.

54.) S.R. Childers, J. Creese, A.M. Snownan und S.H. Snyder, Eur. J. Pharmacol. 55 (1979) 11 - 18.

55.) K.J. Chang, R.J. Miller und P. Cuatrecasas, Molec. Pharmacol. 14 (1978) 961 - 970.

56.) L. Graf, J.I. Szekely, A.Z. Ronai, Z. Dunai-Kovacs und S. Bajusz, Nature 203 (1976) 240 - 242.

57.) H.H. Loh, L.F. Tseng, E. Wei und C.H. Li, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 2895 - 2898.

58.) L.F. Tseng, H.H. Loh und C.H. Li, Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 (1977) 390 - 396.

59.) R.A. North, Life Sci. 24 (1979) 1527 - 1546.

60.) J. Meites, J.F. Bruni, D.A. van Vugt und A.F. Smith, Life Sci. 24 (1979) 1325 - 1336.

61.) H.-Y.T. Yang, J.S. Hong, W. Fratta und E. Costa, Adv. Biochem. Psychopharmacol. 18 (1978) 149 - 159.

62.) M. Sar, W.E. Stumpf, R.J. Miller, K.J. Chang und P. Cuatrecasas, J. Comp. Neurol. 182 (1978) 17 - 38.

63.) J. Hughes, H.W. Kosterlitz und T.W. Smith, Br. J. Pharmacol. 61 (1977) 639 - 647.

64.) V. Clement-Jones, P.J. Lowry, L.H. Rees und G.M. Besser, Nature 283 (1980) 295 - 297.

65.) J.M. Hambrook, B.A. Morgan, M.J. Range und C.F.C. Smith, Nature 262 (1976) 782 - 783.

66.) J. Rossier, E.D. French, C. Rivier, N. Ling, R. Guillemin und F.E. Bloom, Nature 270 (1977) 618 - 620.

67.) H. Akil, S.J. Watson, J.D. Barchas und C.H. Li, Life Sci. 24 (1979) 1659 - 1666.

68.) V. Höllt, O.A. Müller und R. Fahlbusch, Life Sci. 25 (1979) 37 - 44.

69.) V.E. Ghazarossian, R.R. Dent, K. Otsu, M. Ross, B. Cox und A. Goldstein, Analyt. Biochem 102 (1980) 80 - 89.

70.) W.B. Watkins, J.F. Bruni und S.S.C. Yen, J. Histochem. Cytochem. 28 (1980) 1170 - 1174.

71.) G. Augusti-Tocco und G. Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64 (1969) 311 - 315.

72.) T. Amano, E. Richelson und M. Nirenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 258 - 263.

73.) L. Greene und A.S. Tischler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 2424 - 2428.

74.) D. Schubert, S. Heinemann, W. Carlisle, H. Tarikas, B. Kimes, J. Patrick, J.H. Steinbach, W. Culp und B.L. Brandt, Nature 249 (1974) 224 - 227.

75.) B. Hamprecht in: Biochemistry of Sensory Functions (Hrsg. L. Jaenicke) Mosbacher Colloquium 25 (1974) 391 - 423.

76.) B. Hamprecht, Internat. Rev. Cytol. 49 (1977) 99 - 170.

77.) B. Hamprecht, Angew. Chem. 88 (1976) 211 - 223.

78.) J. Traber, Dissertation, Universität München, 1976.

79.) G. Giagnoni, S.L. Sabol und M. Nirenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 2259 - 2263.

80.) E.W. Sutherland, T.W. Rall und T. Menon, J. Biol. Chem. 237 (1962) 1220 - 1227.

81.) W. Wellmann und U. Schwabe, Brain Res. 59 (1973) 371 - 378.

82.) B. Hamprecht und J. Schultz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 1633 - 1641.

83.) W. Klee und M. Nirenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 3474 - 3477.

84.) T. Glaser, Diplomarbeit, Universität München, 1976.

85.) D. van Calker, Dissertation, Universität München, 1977.

86.) J. Traber, K. Fischer, S. Latzin und B. Hamprecht, Proc. 9th Int. Cong. Collegium Internationale Neuro-psychopharmacologicum (1974) 956 - 969.

87.) M. Brandt, Dissertation, Universität München, 1980.

88.) J. Traber, T. Glaser, M. Brandt, W. Klebensberger und B. Hamprecht, FEBS Lett. 81 (1977) 351 - 354.

89.) J. Traber, K. Fischer, S. Latzin und B. Hamprecht, FEBS Lett. 49 (1974) 260 - 263.

90.) S.K. Sharma, W.A. Klee und M. Nirenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 3092 - 3096.

91.) M. Brandt, C. Buchen und B. Hamprecht, J. Neurochem. 34 (1980) 643 - 651.

92.) M. Rodbell, L. Birnbaumer, S.L. Pohl und H.M.J. Kraus, J. Biol. Chem. 246 (1971) 1877 - 1882.

93.) C. Londos und M. Rodbell, J. Biol. Chem. 250 (1975) 3459 - 3465.

94.) K.H. Jakobs, W. Saur und G. Schultz, FEBS Lett. 85 (1978) 167 - 170.

95.) A.J. Blume, D. Lichtshtein und G. Boone, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 5626 - 5630.

96.) F. Propst, Dissertation, Universität Innsbruck, 1981.

97.) A.J. Blume, Life Sci. 22 (1978) 1843 - 1852.

98.) M. Brandt, R.J. Gullis, K. Fischer, C. Buchen, B. Hamprecht, L. Moroder und E. Wünsch, Nature 262 (1976) 311 - 313.

99.) A.S. Stern, R.V. Lewis, S. Kimura, J. Rossier, L.D. Gerber, L. Brink, S. Stein und S. Udenfriend, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 6680 - 6683.

100.) A. Wahlström, M. Brandt, L. Moroder, E. Wünsch, G. Lindeberg, U. Ragnarsson, L. Terenius und B. Hamprecht, FEBS Lett. 77 (1977) 28 - 32.

101.) V. Brantl, H.-J. Teschemacher, A. Henschen und F. Lottspeich, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360 (1979) 1211 - 1216.

102.) F. Lottspeich, A. Henschen, V. Brantl und H.J. Teschemacher, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361 (1980) 1835 - 1839.

103.) K.J. Chang und E. Wei, berichtet 1980 auf der Gordon-Konferenz "Mode of action of opiates", Plymouth, N.H., USA.

104.) C. Zioudrou , R.A. Streaty und W. Klee, J. Biol. Chem. 254 (1979) 2446 - 2449.

105.) W.A. Klee, C. Zioudrou und R.A. Streaty in: Endorphins in Mental Health Research (Hrsg.: E. Usdin, W.E. Bunney und N.S. Kline) (1978) 209 - 218, Macmillan, New York.

106.) V. Erspamer und P. Melchiorri, Proceedings of the International Symposium on "Growth Hormone and Other Biologically Active Peptides", Milan 1979 (Hrsg. A. Pecile und E.E. Müller). Excerpta Medica Amsterdam-Oxford-Princeton, S. 185 - 199.

107.) M. Broccardo, V. Erspamer, G. Falconieri, G. Erspamer, G. Improta, C. Linari, P. Melchiorri und P.C. Montecucchi, Br. J. Pharmacol. (1981) im Druck

108.) R. de Castiglione, F. Faro, G. Perseo und S. Piani, Int. J. Peptide Protein Res. (1981) im Druck.

109.) J. Traber, K. Fischer, S. Latzin und B. Hamprecht, Nature 253 (1975) 120 - 122.

110.) A. Goldstein, L.J. Lowney und B.K. Pal, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1971) 1742 - 1747.

111.) S.H. Snyder, G.W. Pasternak und C.B. Pert in: Handbook of Psychopharmacology (Hrsg. L.J. Iversen, S.D. Iversen und S.H. Snyder) (1975) 329 - 360, Plenum, New York.

112.) P. Cuatrecasas, Rec. Progr. Horm. Res. 31 (1975) 37 - 94.

113.) H.H. Loh, T.M. Cho, Y.C. Wu, R.H. Harris und E.L. Way in: The Opiate Narcotics (Hrsg. A. Goldstein) (1975), Pergamon Press, New York.

114.) C.B. Pert und S.H. Snyder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973) 2243 - 2247.

115.) O. Morini, M.G. Caron, A. de Lean und F. Labrie, Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 (1976) 940 - 946.

116.) R.J. Miller, K.J. Chang, J. Leighton und P. Cuatrecasas, Life Sci. 22 (1978) 379 - 388.

117.) L. Diekmann-Gerber, S. Stein, M. Rubinstein, J. Wideman und S. Udenfriend, Brain Res. 151 (1978) 117 - 126.

118.) M. Brandt, C. Buchen und B. Hamprecht, FEBS Lett. 80 (1977) 251 - 254.

119.) P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier und R. Guillemin, Science 179 (1973) 77 - 79.

120.) T. Hökfelt, S. Efendic, O. Johansson, R. Luft und A. Arimura, Brain Res. 80 (1974) 165 - 169.

121.) M. P. Dubois, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 1340 - 1343.

122.) A. Arimura, H. Sato, A. Dupont, N. Nishi und A.V. Schally, Science 189 (1975) 1007 - 1009.

123.) T. Hökfelt, O. Johansson, S. Efendic, R. Luft und A. Arimura, Experientia 31 (1975) 852 - 854.

124.) W. Vale, P. Brazeau, C. Rivier, M. Brown, B. Boss, J. Rivier, R. Burgus, N. Ling und R. Guillemin, Rec. Progr. Horm. Res. 31 (1975) 365 - 397.

125.) C. Lucke , H.J. Mitzkat und A. von zur Mühlen, Klin. Wschr. 54 (1976) 293 - 301.

126.) J.B. Martin, J. Audet und A. Saunders, Endocrinology 96 (1975) 839 - 847.

127.) N. Kokka, J.F. Garcia, R. George und H.W. Elliott, Endocrinology 90 (1972) 735 - 743.

128.) L. Terenius, Eur. J. Pharmacol. 38 (1976) 211 - 214.

129.) V. Havlicek, M. Rezek, L. Leybin und H. Friesen, Fed. Proc. 36 (1977) 363.

130.) E. Ipp, R. Dobbs und R.H. Unger, Nature 276 (1978) 190 - 191.

131.) R. Elde, T. Hökfelt, O. Johansson und L. Terenius, Neuroscience 1 (1976) 349 - 351.

132.) H. Akil, S.J. Watson, S. Sullivan und J.D. Barchas, Life Sci. 23 (1978) 121 - 126.

133.) M. Pelto-Huikko , A. Hervonen, P. Helen, J. Linnoila, V.M. Pickel und R. Miller in: Histochemistry and Cell Biology of Autonomic Neurons, SIF Cells and Paraneurons (Hrsg. O. Eränkö et al.) (1980) 379 - 383, Raven Press, New York.

134.) J.H. Julliard, T. Shibasaki, N. Ling und R. Guillemin, Science 208 (1980) 183 - 185.

135.) T. Glaser, D. van Calker, M. Müller, W. Klebensberger und B. Hamprecht, Second Europ. Neuroscience Meeting (Florence) (1978) 235, Elsevier, North-Holland.

136.) J. Traber, K. Fischer, C. Buchen und B. Hamprecht, Nature 255 (1975) 558 - 560.

137.) A.G. Gilman und M. Nirenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1971) 2165 - 2168.

138.) R.B. Clark, D.M. Salmon und T.W. Honeyman, J. Cyclic Nucl. Res. 61 (1980) 37 - 49.

139.) B. Hamprecht, W. Kemper und T. Amano, Brain Res. 101 (1976) 129 - 135.

140.) J.E. Bottenstein und G.H. Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 514 - 517.

141.) R. Heumann, D. Stavrou, G. Reiser, M. Öcalan und B. Hamprecht, Europ. J. Cancer 13 (1977) 1417 -1420.

142.) A. Niederwieser, J. Chromatogr. 54 (1971) 215 - 223.

143.) P.W. Holloway, Anal. Biochem. 53 (1973) 304 - 308.

144.) Z. Vogel und M. Altstein, FEBS Lett. 80 (1977) 332 - 336.

145.) J. Hughes, Brain Res. 88 (1975) 295 - 308.

146.) J. Wideman und S. Stein in: Proceedings of the European Society for Neurochemistry (Hrsg. V. Neuhoff) Vol. 1 (1978) S. 457, Verlag Chemie, Weinheim.

147.) T.D. Hexum, H.-Y.T. Yang und E. Costa, Life Sci. 27 (1980) 1211 - 1216.

148.) S.P. Wilson, K. J. Chang und O.H. Viveros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(1980) 4364 - 4368.

149.) S. Kimura, R.V. Lewis, A.S. Stern, J. Rossier, S. Stein und S. Udenfriend, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 1681 - 1685.

150.) R. Simantov und S.H. Snyder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 2515 - 2519.

151.) J.M. Hamburger, B.A. Morgan, M.J. Rance und C.F.C. Smith, Nature 262 (1976) 782 - 783.

152.) A. Dupont, L. Cusan, M. Garon, G. Alvarado-Urbina und F. Labrie, Life Sci. 21 (1977) 907 - 914.

153.) B. Malfroy, J.P. Swerts, A. Guyon, B.Q. Roques und J.C. Schwartz, Nature 276 (1978) 523 - 526.

154.) E. Hazum, K. J. Chang und P. Cuatrecasas, Life Sci. 24 (1979) 137 - 144.

155.) C. Gorenstein und S.H. Snyder, Life Sci. 25 (1979) 2065 - 2070.

156.) R. Simantov, S.R. Childers und S.H. Snyder, Eur. J. Pharmacol. 47 (1978) 319 - 331.

157.) R.J. Miller, K. J. Chang und P. Cuatrecasas, Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 (1977) 1311 - 1317.

158.) R.K. Barclay und M.A. Philipps, Biochem. Biophys. Res. Commun. 81 (1978) 1119 - 1123.

159.) Z. Vogel und M. Altstein, FEBS Lett. 98 (1979) 44 - 48.

160.) A.R. Gintzler , A. Levy und S. Spector, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 2132 - 2136.

161.) A.K. Killian, C.R. Schuster, J.T. House, S. Sholl, M. Connors und B.H. Wainer, Life Sci. 28 (1981) 811 - 817.

162.) C.B. Pert, A. Pert und J.F. Tallman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 2226 - 2230.

163.) L. Pradayrol, N. Vaysse, J. Cassigneul und A. Ribet in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition (Hrsg. G. Rosselin, P. Fromageot und S. Bonfils) (1979) 69 - 77, Elsevier / North-Holland, Amsterdam.

164.) D. Bataille, J. Besson, C. Gespach und G. Rosselin in: Hormone Receptors in Digestion and Nutrition (Hrsg. G. Rosselin, P. Fromageot und S. Bonfils) (1979) 79 - 88, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

165.) E. Spindel und R.J. Wurtman, Brain Res. 201 (1980) 279 - 288.

166.) C.E. Dunlap III, S. Gentleman und L.I. Lowney, J. Chromatogr. 160 (1978) 191 - 198.

167.) J.L. Meek und T.P. Bohan, Adv. Biochem. Psychopharmacol. 18 (1978) 141 - 147.

168.) J.G. Loeber, J. Verhoef, J.P.H. Burbach und A. Witter, Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 (1979) 1288 - 1295.

169.) R.V. Lewis, S. Stein und S. Udenfriend, Int. J. Peptide Protein Res. 13 (1979) 493 - 497.

170.) H.R. Morris, A.T. Etienne, A. Dell und R. Albuquerque, J. Neurochem. 34 (1980) 574 - 582.

171.) R. Simantov und S.H. Snyder, Life Sci. 18 (1976) 781 - 788.

172.) E. Gross in: Methods in Enzymology 11 (Hrsg. C.W. Hirs) (1967) 238- - 255, Academic Press, New York.

173.) J.S. Morley, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20 (1980) 81 - 110.

174.) B.S. Hartley, Biochem. J. 119 (1970) 805 - 822.

175.) S.R. Burzynski, Anal. Biochem. 65 (1975) 93 - 99.

176.) W.R. Gray und B.S. Hartley, Biochem. J. 89 (1963) 59 P.

177.) J.F. Koren, T.B. Melo und S. Prydz, J. Chromatogr. 46 (1970) 129 - 131.

178.) A.H. Coons in: General Cytochemical Methods (Hrsg. J.F. Danielli) (1958) 399 - 422, Academic Press, New York.

179.) L.A. Sternberger in: Immunocytochemistry. Second Edition (1979) Kap.5, 104 - 169, J. Wiley and Sons, New York.

180.) R.J. Miller und V.M. Pickel, J. Histochem. Cytochem. 28 (1980) 903 - 917.

181.) J.A. Weyhenmeyer, M.K. Raizada, R.J. Miller und R.E. Fellows, Brain Res. 181 (1980) 465 - 469.

182.) E.L. Knodel und E. Richelson, Brain Res. 197 (1980) 565 - 570.

183.) J. Hughes, H.W. Kosterlitz und A.T. McKnight, Br. J. Pharmacol. 63 (1978) 396 P.

184.) L. Tan und P.H. Yu, Biochem. Biophys. Res. Commun. 95 (1980) 1901 - 1908.

185.) R.P. Sosa, A.T. McKnight, J. Hughes und H.W. Kosterlitz, FEBS Lett. 84 (1977) 195 - 198.

186.) R. Heumann, M. Öcalan, V. Kachel und B. Hamprecht, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4674 - 4677.

187.) R. Heumann, Dissertation, Technische Universität München, 1978.

188.) R. Heumann, G. Reiser, D. van Calker und B. Hamprecht, zur Publikation eingesandt.

189.) O.S. Pettengill, C.S. Faulkner, D.H. Wurster-Hill, L.H. Maurer, G.D. Sorenson, A.G. Robinson und E.A. Zimmermann, J. Natl. Cancer Inst. 58 (1977) 511 - 518.

190.) D. van Calker, M. Müller und B. Hamprecht in: Neurol. Growth and Differentiation (Hrsg. E. Meisami und M.A.B. Brazièr) (1979) 11 - 25, Raven Press, New York.

191.) S.J. Said und R.N. Rosenberg, Science 192 (1976) 907 - 908.

192.) E. Richelson, J. Neurochem. 21 (1973) 1139 - 1145.

193.) R. Heumann, G. Valet, D. Maison, J. Kemper, G. Reiser und B. Hamprecht, J. Cell Sci. 27 (1977) 141 - 155.

194.) S.L. Sabol, Biochem. Biophys. Res. Commun. 82 (1978) 560 - 567.

195.) A. Beaumont und J. Hughes, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19 (1979) 245 - 267.

196.) O.H. Viveros, E.J. Diliberto, Jr., E. Hazum und K. J. Chang, Molec. Pharmacol. 16 (1979) 1101 -1108.

197.) K. Kürzinger, Dissertation, Universität München, 1978.

198.) R. McGee, P. Simpson, C. Christian, M. Marta, P. Nelson und M. Nirenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1314 - 1318.

199.) T. Duka, M. Wüster und A. Herz, Life Sci. 26 (1980) 771 - 776.

200.) D. Wesche, V. Höllt und A. Herz, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 301 (1977) 79 - 82.

201.) E. Costa, W. Fratta, J.S. Hong, F. Moroni und H.-Y.T. Yang, Adv. Biochem. Psychopharmacol. 18 (1978) 217 - 226.

202.) R. Simantov und S.H. Snyder, Nature 262 (1976) 505 - 507.

203.) J. Rossier, E. French, C. Gros, S. Minick, R. Guillemin und F.E. Bloom, Life Sci. 25 (1979) 2105 - 2112.

204.) R. Heumann, M. Öcalan und B. Hamprecht, FEBS Lett. 107 (1979) 37 - 41.

205.) K. Hallermayer, C. Harmening und B. Hamprecht, J. Neurochem. (1981) im Druck.

206.) G.P. Lewis und P.J. Piper, Nature 254 (1975) 308 - 311.

207.) B.S. McEwen, Review of Neuroscience 4 (1979) 1 - 30.

208.) B.S. McEwen, P.G. Davis, B. Parsons und D.W. Pfaff, Ann. Rev. Neurosci. 2 (1979) 65 - 112.

209.) J.S. Hong, H.-Y.T. Yang, W. Fratta und E. Costa, J. Pharmacol. Exp. Ther. 205 (1978) 141 - 147.

210.) J.C. Gillin, J.S. Hong, H.-Y.T. Yang und E. Costa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 2991 - 2993.

211.) H.W. Kosterlitz und J. Hughes, Life Sci. 17 (1975) 91 - 96.

212.) H. Osborne, V. Höllt und A. Herz, Life Sci. 22 (1978) 611 - 618.

213.) A. Hervonen, M. Pelto-Huikko und J. Linnoila, Amer. J. Anat. 157 (1980) 445 - 448.

214.) G. Henderson, J. Hughes und H.W. Kosterlitz, Nature 271 (1978) 677 - 679.

215.) L.L. Iversen, S.D. Iversen, F.E. Bloom, T. Vargo und R. Guillemin, Nature 271 (1978) 679 - 681.

216.) A. Bayon, J. Rossier, A. Mauss, F.E. Bloom, L.L. Iversen, N. Ling und R. Guillemin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3503 - 3506.

217.) J.A. Richter, D.L. Wesche und R.C.A. Frederickson, Eur. J. Pharmacol. 56 (1979) 105 - 113.

218.) J. Lindberg und J.L. Dahl, J. Neurochem. 36 (1981) 506 - 512.

219.) H. Takagi , H. Shiomi, H. Ueda und H. Amano, Nature 282 (1979) 410 - 412.

220.) K. Wagner, unveröffentlichte Versuche.

221.) G.D. De Haas, N.M. Postema, W. Nieuwenhuizen und L.L.M. van Deenen, Biochim. Biophys. Acta 159 (1968) 103 - 117.

222.) P.M. Lad , M.S. Preston, A.F. Welton, T.B. Nielsen und M. Rodbell, Biochim. Biophys. Acta 511 (1979) 368 - 381.

223.) T. Amano, B. Hamprecht und W. Kemper, Exp. Cell Res. 85 (1974) 399 - 408.

224.) P. Benda, J. Lightbody, G. Sato, L. Levine und W. Sweet, Science 161 (1968) 370 - 371.

225.) J.W. Littlefield, Science 145 (1964) 709 - 710.

226.) J. Minna, D. Glazer und M. Nirenberg, Nature New Biol. 235 (1972) 225 - 231.

227.) T. Amano, E. Richelson und M. Nirenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 258 - 263.

228.) J.W. Littlefield, Biochem. Biophys. Acta 95 (1965) 14 - 22.

229.) D. van Calker und B. Hamprecht in: Advances in Cellular Neurobiology (Hrsg. S. Federoff und L. Hertz), Vol. 1 (1980) 31 - 67.

230.) E. Miyamoto, J.F. Kuo und P.J. Greengard, J. Biol. Chem. 244 (1969) 6395 - 6402.

231.) A.G. Gilman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67 (1970) 305 - 312.

232.) Sephadex Gel Filtration, Theory and Praxis, Firmenschrift Pharmacia, Uppsala.

233.) Laboratory Manual, Firmenschrift Whatman, Maidstone.

234.) Datenblatt für ^{3}H-Leu-Enkephalin, Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig.

235.) E. Schiltz, K.D. Schnackerz und R.W. Gracy, Anal. Biochem. 79 (1977) 33 - 41.

236.) H.-J. Engeser, Dissertation, Universität München, 1978.

237.) P.H. Petra in: Methods in Enzymology 19 (Hrsg. G.E. Perlman und L. Lorand) (1970) 460 - 503, Academic Press, New York.

238.) C.H.W. Hirs in: Methods in Enzymology 11 (Hrsg. C.W.H. Hirs) (1967) 197 - 199, Academic Press, New York.

239.) Organikum, 11. Auflage (1972), S. 600, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

240.) K. Hallermayer, Diplomarbeit, Universität München, 1977.

241.) N.N. Osborne in: Microchemical Analysis of Nervous Tissue (1974) 58 - 121, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney.

242.) W.R. Gray in: Methods in Enzymology 25 B (Hrsg. C.H.W. Hirs und S.N. Timasheff) (1972) 121 - 138, Academic Press, New York.

243.) R. Adler und S. Varon, Dev. Biol. 69 (1979) 424 - 435.

244.) S.J. Holt, Exp. Cell Res. Suppl. 7 (1959) 1 - 27.

245.) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265 - 275.

246.) F. Propst und B. Hamprecht, J. Neurochem. 36 (1981) 580 - 588.

LEBENSLAUF

25.10.1950	geboren in München als Sohn von Dr. med. vet. Richard Glaser und seiner Frau Gertrud, geb. Baule
Sept. 1957 - 1961	Volksschule Holzkirchen
1961 - 1970	Humanistisches Gymnasium Tegernsee
ab Herbst 1970	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilian-Universität München
Mai 1973	Diplomvorprüfung
Sommer 1975	mündliche Diplomhauptprüfung
Sept. 1975 - Dez. 1976	Ausführung der Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. B. Hamprecht am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Jan. 1977 - März 1981	Ausführung vorliegender Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. B. Hamprecht am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, und am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Würzburg
Dez. 1978	Eheschließung mit Gabriele Bohrer